

Untersuchungen zum oxidativen Stress bei Hämodialysepatienten

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

D 386

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemiker Christoph Müller

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17.09.2003

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2003

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen April 2000 und April 2003 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17.09.2003

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand und Frau Dr. C. Janzowski für die Überlassung des Themas sowie für Anregungen und die wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit.

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	4
2.1	Reaktive Sauerstoffspezies, ihre Reaktionen und die Folgen	4
2.2	Antioxidative Abwehrmechanismen	7
2.3	Lipidperoxidation	14
2.4	DNA-Schädigung und Reparatur	16
2.5	Oxidativer Stress und Krankheiten	21
2.6	Nieren, Niereninsuffizienz, Hämodialyse und oxidativer Stress	22
2.6.1	Dialysemembranen	26
2.6.2	Anämie in Verbindung mit Niereninsuffizienz	28
2.7	Nierentransplantation	28
2.8	Molecular Adsorbent Recycling System (MARS)	29
2.9	Testmethoden	30
2.9.1	Harnsäure-Bestimmung	30
2.9.2	Glutathion-Bestimmung	31
2.9.3	Malondialdehyd-Bestimmung	33
2.9.4	M ₁ dG-Bestimmung	33
2.9.5	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden	34
3	Problemstellung	38
4	Ergebnisse und erste Diskussion	41
4.1	Methodische Arbeiten	41
4.1.1	Vorarbeiten zur Bestimmung des Glutathiongehaltes in Vollblut	41
4.1.2	Etablierung der Malondialdehyd-Bestimmung	41
4.1.2.1	Variation der Derivatisierung	41
4.1.2.2	Variation des Fließmittels	42
4.1.3	Etablierung der M ₁ dG-Bestimmung	45
4.1.3.1	Herstellung und Quantifizierung der M ₁ dG-Standard-DNA per HPLC	45
4.1.3.2	Etablierung des Immunoslotblots	47
4.2	Untersuchung von HD-Patienten und Probanden	51
4.2.1	Vergleich von Patienten vor HD und Probanden	51
4.2.1.1	Harnsäure-Bestimmung	52
4.2.1.2	Glutathion-Bestimmung	53
4.2.1.3	Malondialdehyd-Bestimmung	54
4.2.1.4	M ₁ dG-Bestimmung	55

4.2.1.5	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	56
4.2.1.6	Diskussion	56
4.2.2	Patienten während HD	60
4.2.2.1	Harnsäure-Bestimmung.....	60
4.2.2.2	Glutathion-Bestimmung	60
4.2.2.3	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	62
4.2.2.4	Diskussion	63
4.2.3	Untersuchung des Einflusses der Dialysemembranen	64
4.2.3.1	Malondialdehyd-Bestimmung.....	65
4.2.3.2	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	66
4.2.3.3	Diskussion	67
4.2.4	Einfluss der Anämiebehandlung mit Ferrlecit®	67
4.2.4.1	Malondialdehyd-Bestimmung.....	68
4.2.4.2	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	70
4.2.4.3	Diskussion	70
4.3	Lebererkrankungen und Molecular Adsorbent Recycling System (MARS)	72
4.3.1	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	72
4.3.2	Diskussion	75
4.4	Patienten nach Nierentransplantation.....	76
4.4.1	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	76
4.4.2	Diskussion	77
4.5	Erste Versuche zur Intervention mit einem flavonoid-/polyphenolreichen Mischfruchtsaft.....	77
4.5.1	Malondialdehyd-Bestimmung.....	78
4.5.2	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	79
4.5.3	Diskussion	79
5	Zusammenfassende Diskussion.....	81
6	Zusammenfassung.....	85
7	Material und Methoden	87
7.1	Allgemeines, Geräte, Materialien und Lösungen.....	87
7.2	Harnsäure-Bestimmung.....	90
7.3	Glutathion-Bestimmung	90
7.4	Malondialdehyd-Bestimmung.....	92
7.5	Herstellung einer M ₁ dG-Standard-DNA und Quantifizierung per HPLC	93

7.6	M ₁ dG-Bestimmung	94
7.7	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	96
8	Literatur	99
9	Anhang	114
9.1	Untersuchung von Probanden und Patienten	114
9.1.1	Vergleich von Patienten vor HD und Probanden	114
9.1.1.1	Harnsäure-Bestimmung.....	114
9.1.1.2	Glutathion-Bestimmung	115
9.1.1.3	Malondialdehyd-Bestimmung.....	116
9.1.1.4	M ₁ dG-Bestimmung	116
9.1.1.5	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	117
9.1.2	Patienten während HD	118
9.1.2.1	Harnsäure-Bestimmung.....	118
9.1.2.2	Glutathion-Bestimmung	118
9.1.2.3	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	119
9.1.3	Untersuchung des Einflusses der Dialysemembranen in einer Cross Over Studie	120
9.1.3.1	Malondialdehyd-Bestimmung.....	120
9.1.3.2	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	120
9.1.4	Einfluss der Anämiebehandlung mit Ferrlecit®	121
9.1.4.1	Malondialdehyd-Bestimmung.....	121
9.1.4.2	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	121
9.1.5	Lebererkrankungen und Molecular Adsorbent Recycling System	122
9.1.5.1	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	122
9.1.6	Patienten nach Nierentransplantation.....	126
9.1.6.1	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	126
9.1.7	Erste Versuche zur Intervention mit einem flavonoid/polyphenolreichen Mischfruchtsaft.....	127
9.1.7.1	Malondialdehyd-Bestimmung.....	127
9.1.7.2	Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)	127

Abkürzungsverzeichnis

4-HNE	4-Hydroxynonenal
4-AAP	4-Aminoantipyrin
5-SSA	5-Sulfosalicylsäure
8-OH-dG	8-Oxo-desoxyguanin, 8-Hydroxy-desoxyguanin
ACE	Vitamine A, C und E
AGE	Advanced Glycation Endproducts
AP-Stelle	Apurine/Apyrimidine Stelle
BDI	Bleomycin Detectable Iron
BHT	t-Butylhydroxytoluol
CAT	Katalase
CT-DNA	Calf Thymus DNA
CYP	Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen
Cys	Cystein
dA	Desoxyadenosin
dC	Desoxycytosin
dG	Desoxyguanosin
DHBS	3,5-Dichloro-2-hydroxyphenylsulfonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
dT	Desoxythymidin
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EPO	Erythropoietin
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	Reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FaPy	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
FMN	Flavin-Mononukleotid
FMNH ₂	Reduziertes Flavin-Mononukleotid
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Reduziertes Glutathion

GSR	Glutathion-Reduktase
GSSG	Oxidiertes Glutathion
HD	Hämodialyse
HEPES	4-[(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
LDL	Low Density Lipoproteins
LMA	Low Melting Agarose
LPO	Lipidperoxidation
LV	Leberversagen
M ₁ dA	Malondialdehyd-Desoxyadenosin-Addukt
M ₁ dC	Malondialdehyd-Desoxycytosin-Addukt
M ₁ dG	Malondialdehyd-Desoxyguanosin-Addukt, Pyrimido-[1,2 ^a]purin-10(3H)-on
MARS	Molecular Adsorbent Recycling System
MDA	Malondialdehyd
MN	Micrococcal Nuklease
NMA	Normal Melting Agarose
NT	Nierentransplantation
PMMA	Polymethylmethacrylat
PSu	Polysulfon
RAGE	Rezeptoren für Advanced Glycation Endproducts
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SOD	Superoxiddismutase
SPDE	Calf Spleen Phosphodiesterase
SSB	DNA-Einzelstrangbrüche
SSCC-Puffer	Natriumsuccinat Calciumchlorid-Puffer
TA	Triethylammoniumacetat
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TEAC	Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity
tGSH	Gesamtglutathion (GSH+GSSG)
TI%	tail intensity in %
TMP	Tetramethoxypropan
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoesäure

1 Einleitung

Das Element Sauerstoff existiert in der Luft als zweiatomiges Molekül O_2 . Außer einigen anaeroben und aerotoleranten einzelligen Organismen benötigen alle Bakterien, Pflanzen und Tiere Sauerstoff für eine effiziente Energiegewinnung. Diese läuft z. B. bei eukaryontischen Zellen in den Mitochondrien über eine O_2 -abhängige Elektronentransportkette ab. Durch die Verwendung des reaktiven Gases O_2 als Elektronenakzeptor werden die aeroben Organismen einem oxidativen Stress in Form von so genannten „Reaktiven Sauerstoffspezies“ (ROS) ausgesetzt. Diesen oxidativen Stress versuchen die Lebewesen mit einer starken antioxidativen Abwehr auszugleichen. In gesunden aeroben Lebewesen hält sich die Bildung von ROS und das abwehrende, antioxidative System etwa die Waage.

Zu den ROS gehören neben Hydroxy-, Alkoxy- und Superoxidanion-Radikal auch Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff und Ozon. Diese schädigenden Moleküle werden durch enzymatische und nicht-enzymatische Abwehrmechanismen abgefangen, die dem oxidativen Stress protektiv entgegenwirken (primärer antioxidativer Schutz). Die enzymatische Abwehr wird z. B. durch die Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase vermittelt, die die ROS in weniger reaktive Moleküle umwandeln. Unter nicht-enzymatischem Schutz versteht man das Abfangen reaktiver Spezies z. B. durch Radikalfänger wie Vitamin A, Vitamin C und Vitamin E, sowie Harnsäure und Glutathion. (Halliwell & Gutteridge, 1999)

Übersteigt die ROS-Produktion die primären antioxidativen Schutzmechanismen, dann werden nicht alle ROS abgefangen, sondern schädigen direkt oder indirekt zelluläre Bestandteile. Hier kommt das sekundäre antioxidative Schutzsystem zum Einsatz, das die Schäden entweder repariert oder die geschädigten Moleküle ersetzt, da sie sonst akkumulieren. Ein starker Überschuss prooxidativer Prozesse kann über den oxidativen Stress zu schweren Dauerschäden führen.

Durch den oxidativen Stress werden Proteine, Lipide und DNA modifiziert. Die DNA-Schäden können durch direkte Reaktion von ROS mit der DNA entstehen. Auch im Zuge des Stoffwechsels gebildete Sekundärprodukte können die DNA schädigen, wodurch Mutationen induziert werden können. ROS sind deshalb bei der Tumorentstehung und -förderung relevant (Klaunig et al., 1998; Loft et al., 1996). Eine chronische Exposition mit ROS führt zur Oxidation von Lipiden (Lipidperoxidation, LPO), was zu Veränderungen der Zellmembranviskosität und des Zytoskeletts sowie zur Erhöhung des Anteils oxidierten Lipoproteins führt. Vorzeitiges biologisches Altern und verringerte Reaktivität phagozytischer Zellen gehören eben-

falls zu den Folgen (Peuchant et al., 1994; McGrath et al., 1995; Beckman et al., 1998; Vanholder et al., 1993). Werden Proteine durch ROS oder Folgeprodukte geschädigt, können Enzyme ihre Aktivität verlieren. Es kann weiterhin zu Veränderungen von Rezeptoren und Transportproteinen kommen, so dass diese Vorgänge den gesamten Zellstoffwechsel beeinflussen (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Durch eine verstärkte Bildung von ROS oder eine verminderte antioxidative Leistung des Körpers kommt es zu pathophysiologischen Erscheinungen (s. Tabelle 1.1). Bei Erkrankungen wie z. B. rheumatoider Arthritis, hämorrhagischem Schock, Kardiomyopathie oder Atherosklerose bis zu AIDS (weitere Beispiele s. Tabelle 1.1) scheinen ROS eine Rolle zu spielen. Allerdings ist oft unklar, ob sie Ursache oder ein begleitender Faktor sind.

Tabelle 1.1: Beispiele für pathologische Veränderungen, bei denen oxidativer Stress auftritt (nach Halliwell & Gutteridge, 1999)

Kategorie	Beispiel
Niere	Glomerulonephritis, Niereninsuffizienz, Hämodialyse, Transplantation
Ischämie-Reperfusion	Schlaganfall, Organtransplantation
Xenobiotika-Toxizität	Tetrachlorkohlenstoff, Paraquat, Ethanol, Paracetamol,
Erythrozyten	Bleivergiftung, Malaria, Sichelzellanämie
Gehirn	M. Alzheimer, M. Parkinson, Schlaganfall, multiple Sklerose

Auch die Niereninsuffizienz ist mit einem erhöhten oxidativen Stress verbunden. Unter Niereninsuffizienz versteht man jede Verringerung der Nierenleistung bis hin zur Urämie (terminale Niereninsuffizienz, Harnvergiftung). Die Nierenfunktion wird dabei über die Blutwerte von Harnstoff und Kreatinin bestimmt. Je höher die Gehalte dieser Substanzen im Plasma, desto schlechter ist die Nierenfunktion. Eine Urämie hat Auswirkungen auf den gesamten Organismus: z. B. Magen-Darm-Trakt (Erbrechen), Blutsystem (Anämie), Nervensystem (Polyneuropathien) bis hin zum urämischem Koma. Behandelt wird die Urämie durch streng bilanzierte Diäten und Nierenersatztherapien wie Hämodialyse (HD) oder Nierentransplantation (NT). (Sarre et al., 1988; Hildebrandt et al., 1993; Hasselwander et al., 1998; Canaud et al., 1999; Galli et al., 2000)

Der erhöhte oxidative Stress bei Dialysepatienten wird für eine Reihe gehäuft auftretender Folgeerkrankungen mitverantwortlich gemacht. An erster Stelle stehen hier kardiovaskuläre Erkrankungen, einschließlich beschleunigter Atherosklerose, die bei diesen Patienten 10 bis 20 Jahre früher auftreten als bei der Normalbevölkerung und die für ca. 60% der Todesfälle

verantwortlich sind (Canaud et al., 1999). Weiterhin treten gehäuft Infektionen aufgrund einer verringerten Immunkompetenz auf. Auch das Krebsrisiko ist bei Patienten mit chronischem Nierenversagen erhöht, wobei überwiegend Niere, Blase, Schilddrüse und andere endokrine Organe betroffen sind (Maisonnette et al., 1999; Vamvakas et al. 1997).

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Reaktive Sauerstoffspezies, ihre Reaktionen und die Folgen

Unter oxidativem Stress versteht man das Ungleichgewicht in der Entstehung und der Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Organismen. Da ROS ein hohes Potential besitzen Gewebe und Zellbestandteile wie Membranen, DNA und Proteine zu schädigen, steht der oxidative Stress im Mittelpunkt zahlreicher Forschungsaktivitäten. (Kelly et al., 1998)

Im Folgenden werden ROS, ihre Bedeutung für einige Erkrankungen und antioxidative Abwehrmechanismen (Übersicht s. Abbildung 2.1) näher erläutert.

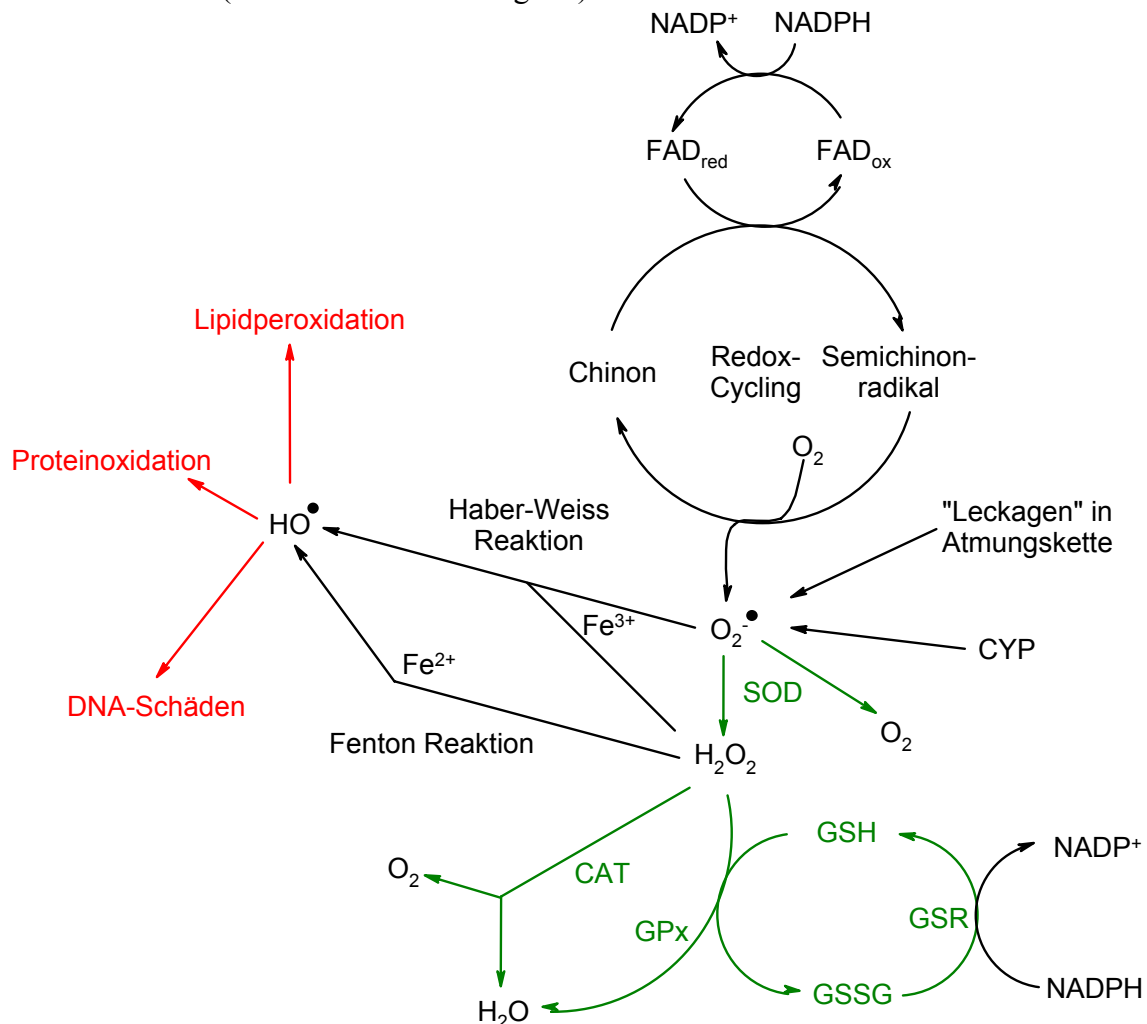


Abbildung 2.1: Beispiele für die Entstehung verschiedener ROS, Abwehrmechanismen und Schädigungen (grün: Entgiftung, rot: direkte Folgen von ROS-Reaktionen; modifiziert nach Kelly et al., 1998; Sies, 1985); CAT: Katalase, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion, GPx: Glutathionperoxidase, GSR: Glutathionreduktase, SOD: Superoxiddismutase, CYP: Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen

Der Begriff „ROS“ ist eine Sammelbezeichnung für radikalische und nicht-radikalische Sauerstoffderivate (s. Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Beispiele für radikalische und nicht-radikalische ROS; R: Alkylrest

radikalische ROS	nicht-radikalische ROS
Superoxidradikalanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
Hydroxyl-Radikal (OH^\bullet)	Ozon (O_3)
Alkoxy-Radikale (RO^\bullet)	Alkylhydroperoxide (ROOH)
Alkylperoxy-Radikale (ROO^\bullet)	hypochlorige Säure (HOCl)
	Peroxynitrit (ONOO^-)

Das O_2 -Molekül zeigt im Grundzustand mit zwei ungepaarten Elektronen (Triplettzustand) radikalähnliche Eigenschaften und reagiert bevorzugt mit Radikalen. In der Atmungskette entsteht durch Einelektronen-Reduktion von $\text{O}_2^{\cdot-}$, durch Zwei Elektronen-Reduktion mit anschließender Protonierung H_2O_2 (s. Abbildung 2.2). Aus H_2O_2 kann entweder das hochreaktive OH^\bullet über die Fentonreaktion (s. Gleichung 2.2) entstehen, oder durch Reduktion mit zwei Elektronen schließlich H_2O .

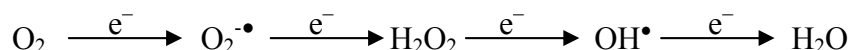
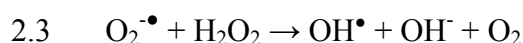
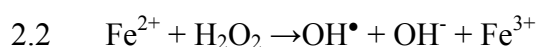
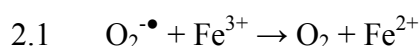


Abbildung 2.2: Reduktion von O_2 zu H_2O

Das **Hydroxylradikal OH^\bullet** wirkt als reaktivste Sauerstoffspezies (Sies, 1991) mit einem Standardreduktionspotential von 2,31V stark oxidierend (Halliwell & Gutteridge, 1999). OH^\bullet kann in vielen biologisch relevanten Systemen entstehen wie z. B. durch die Schwermetallionen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion (z. B. Kupfer oder Eisen, Gleichung 2.3) aus $\text{O}_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 . Die Eisenionen-katalysierte Teilreaktion wird auch als Fentonreaktion bezeichnet (s. Gleichung 2.1 und 2.2, Eisenbrand & Metzler, 2001).



Durch UV-Licht-induzierte homolytische Spaltung von H_2O_2 oder durch die Zersetzung von Wasser durch ionisierende Strahlung wird ebenfalls OH^\bullet gebildet (Halliwell & Gutteridge, 1999).

OH^\bullet -Radikale bevorzugen drei Reaktionstypen, die u. a. bei der Autoxidation von Fetten eine Rolle spielen: Wasserstoffabstraktion, Addition und Elektronentransfer.

Das **Superoxidradikalanion** $\text{O}_2^{\bullet-}$ wird im Organismus durch einige Enzyme gebildet, die O_2 zu $\text{O}_2^{\bullet-}$ reduzieren (s. Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Beispiele für Enzyme, die $\text{O}_2^{\bullet-}$ generieren (nach Halliwell & Gutteridge, 1999)

Enzym	Lokalisation
Peroxidasen	Pflanzen, Bakterien, Tiere (Myeloperoxidase in Leukozyten)
Xanthin-Oxidase	Darm, ischämisches Gewebe
Tryptophan-Dioxygenase	Leber
Aldehyd-Oxidase	Leber

Die Xanthin-Oxidase katalysiert die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin. Dabei werden Elektronen zu geringen Anteilen auf O_2 anstatt auf NAD^+ übertragen. Hämproteine, die $\text{O}_2^{\bullet-}$ nach O_2 -Bindung und Elektronentransport von Fe^{2+} zu O_2 freisetzen, und Elektronentransportketten, wie in Cytochrom P450-Enzymen oder in den Mitochondrien, gelten als wichtigste $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Quellen. Hier kommt es durch „Leckage“ zur direkten Elektronenübertragung auf Sauerstoff. Etwa 1-3% des in den Mitochondrien verbrauchten O_2 wird zu $\text{O}_2^{\bullet-}$ reduziert, wodurch die erhöhte oxidative Schädigung der mitochondrialen DNA erklärt wird. (Halliwell & Gutteridge, 1999; Wei, 1998)

Des Weiteren wird $\text{O}_2^{\bullet-}$ durch Autoxidationsreaktionen einiger Moleküle wie flavinenthaltende Reduktionsäquivalente, Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin gebildet (Sies, 1991).

Xenobiotika generieren durch so genanntes „Redox-Cycling“ ebenfalls $\text{O}_2^{\bullet-}$. Hierbei nimmt ein Chinon von einer Reduktase ein Elektron auf, das dann auf O_2 übertragen wird. Dieser Prozess ist für die Toxizität vieler Stoffe mitverantwortlich. (Eisenbrand & Metzler, 2001)

Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ entsteht durch Lichtanregung und ist hinsichtlich Reaktionen mit Molekülen im Singulettzustand (z. B. Fettsäuren) wesentlich aktiver als der Grundzustand von O_2 . $^1\text{O}_2$ reagiert mit ungesättigten Fettsäuren in einer Art „Cyclo-Addition“. (Belitz et al., 1992)

Wasserstoffperoxid H_2O_2 wird durch enzymabhängige Prozesse gebildet. Guanyl-Cyclase, Glucose-Oxidase, Monoamin-Oxidase oder Superoxiddismutase (SOD, s. Kapitel 2.2) generieren H_2O_2 , das nur noch schwach oxidierend wirkt und somit nur schwach reaktiv ist (Sies, 1991; Kelly et al., 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999). Es kann direkt keine DNA und Lipide oxidieren. Bei manchen Proteinen lassen sich durch H_2O_2 Thiol-Gruppen oxidieren, die dadurch auch inaktiviert werden können. Die wesentliche Schädigung durch H_2O_2 beruht auf der Bildung von hochreaktiven OH^\bullet , die durch Metallionen-katalysierte Reaktion wie der Fentonreaktion entstehen (s. Gleichung 2.2).

Die Reaktivität der verschiedenen ROS spiegelt sich in der Halbwertszeit wieder (s. Tabelle 2.3): das hochreaktive OH^\bullet besitzt die kürzeste Halbwertszeit, wohingegen aus H_2O_2 stabile Lösungen herstellbar sind.

Tabelle 2.3: geschätzte Halbwertszeiten einiger ROS (nach Sies, 1991)

	Halbwertszeit
OH^\bullet	10^{-9}s
Alkyl-Radikal	10^{-8}s
$^1\text{O}_2$	10^{-6}s
Alkoxy-Radikal	10^{-6}s
Alkyl-Peroxy-Radikal	7s
$\text{O}_2^{\bullet-}$	spontane und enzymatische Dismutation
H_2O_2	stabil

Im Körper entstehen ROS durch die oben geschilderten Prozesse. Sie sind nicht immer nur schädigende Nebenprodukte einer Enzymreaktion, sondern werden z. B. aktiv von Leukozyten gebildet, um Mikroorganismen zu bekämpfen (Delves et al., 2000). Des Weiteren werden ROS bei der Synthese der Entzündungsmediatoren Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane aus Arachidonsäure benötigt (Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.2 Antioxidative Abwehrmechanismen

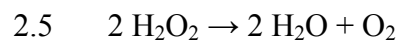
Da Sauerstoff und ROS sehr reaktive Moleküle sind, brauchen aerobe Organismen effiziente Schutzmechanismen.

a) Enzymatischer Abbau von ROS

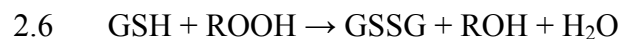
In Eukaryonten sind drei Isoformen der so genannten **Superoxiddismutase** (SOD) bekannt: Mangan-SOD, Kupfer/Zink-SOD und extrazelluläre SOD (Kelly et al., 1998). Alle drei Formen besitzen die Fähigkeit, $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 und O_2 zu dismutieren (s. Gleichung 2.4).



Die **Katalase** (CAT) kann das von der SOD gebildete H_2O_2 schnell und effektiv zu Wasser und O_2 umsetzen (s. Gleichung 2.5). Sie enthalten entweder Mangan oder eine Häm-Gruppe im katalytischen Zentrum und kommen hauptsächlich in den Peroxisomen vor (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Glutathionperoxidasen (GPx) reduzieren organische Peroxide (ROOH) und H_2O_2 . Die Reduktionsäquivalente werden von dem nicht-enzymatischen Antioxidanz Glutathion (GSH) bereitgestellt (s. Gleichung 2.6, Kelly et al., 1998).



Wichtig für die Funktion der GPx ist die Glutathion-Reduktase (GSR), die mit NADPH als Kofaktor das oxidierte Glutathion (GSSG) wieder zu GSH reduziert (s. Abbildung 2.1).

b) Proteine, die die Aktivität von Prooxidantien (z. B. Eisen-, Kupferionen) minimieren

Das Glykoprotein **Transferrin** fängt freie Eisenionen im Blutplasma ab (Konzentration: 1,2-3,7g/l), die in gebundener Form nicht mehr redoxaktiv sind. Die Eisenionen werden anschließend in das Speicherprotein Ferritin eingebaut. (Roob et al., 2000; Fresenius Kabi, 1999; Eisenbrand et al., 1995a)

Kupferionen binden an das Plasmaprotein **Albumin** und an das spezifische Transport- und Speicherprotein **Caeruloplasmin** und werden so inaktiviert (Halliwell & Gutteridge, 1999).

c) Proteine, die andere Biomoleküle durch andere Mechanismen vor Schäden schützen

Einige Hitzeschockproteine wie die Chaperone schützen neu gebildete Proteine vor ihrer Umgebung, so dass sie sich richtig falten können (Stryer, 1996).

d) niedermolekulare Substanzen, die ROS abfangen können:

Die Eigenschaft dieser „Radikalfänger“ beruht i. A. auf der Bildung von resonanzstabilisierten Radikalen, die nicht zu Wasserstoffabstraktionen oder Elektronentransfers fähig sind. Diese Stoffe unterteilen sich in exogene, über die Nahrung aufgenommene Stoffe, und endogene, also vom Körper selbst produzierte Antioxidantien:

Die wasserlösliche **Ascorbinsäure** (Vitamin C) wird über die Nahrung aufgenommen. Obst und Gemüse wie Äpfel, Zitrusfrüchte, Kartoffeln oder Tomaten enthalten 10-50mg/100g Vitamin C. Ascorbinsäure kann direkt ROS abfangen und ist auch Kofaktor zahlreicher Enzyme (z. B. Prolin- und Lysin-Hydroxylase). Durch Abgabe eines Elektrons entsteht ein resonanzstabilisiertes Radikalanion (Semidehydroascorbinsäure), bei Abgabe von zwei Elektronen Dehydroascorbinsäure (s. Abbildung 2.3, Belitz et al., 1992).

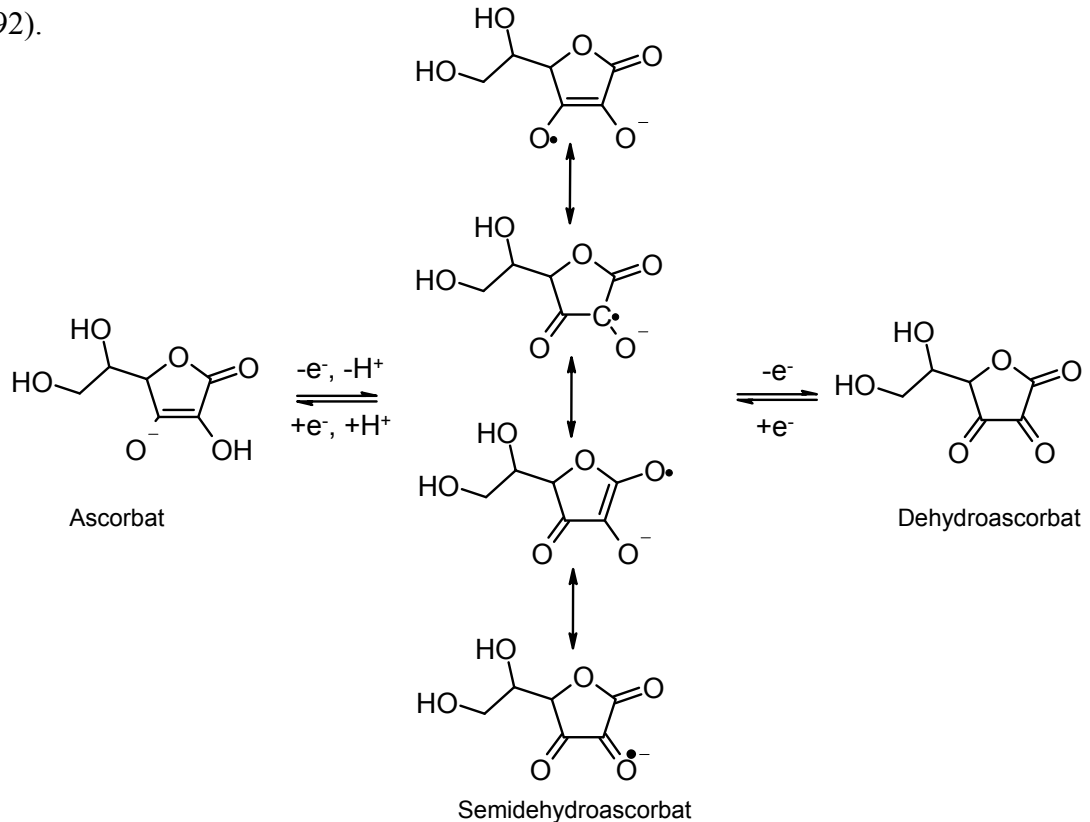


Abbildung 2.3: Struktur von Ascorbat, Resonanzstabilisierung von Semidehydroascorbat und Oxidation zu Dehydroascorbat (nach Halliwell & Gutteridge, 1999)

In vitro zeigte Ascorbinsäure wie auch andere Antioxidantien prooxidative Eigenschaften, da es Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren und damit die Bildung von OH^\bullet aus H_2O_2 fördern kann (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Das fettlösliche **Vitamin E** (Sammelbezeichnung für α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Tocopherole und Tocotrienole) wird vor allem über Fette und Öle aufgenommen (z. B. Butter: 2,2mg α -Tocopherol/100g, Olivenöl: 12mg α -Tocopherol/100g). Vitamin E besteht aus einem Chromanring (mit unterschiedlichem Methylierungsmuster) und einer lipophilen Phytolseitenkette (s. Abbildung 2.4). Es wirkt wie das Antioxidanz Ascorbinsäure als Radikalfänger, allerdings schützt es als lipophiles Molekül vor allem Membranlipide und LDL vor der Oxidation (Eisenbrand et al., 1995a). Vitamin E unterbricht die Lipidperoxidation, übernimmt die Energie der angeregten Elektronen von $^1\text{O}_2$ und gibt diese Energie strahlungslos ab (Quenching) oder fängt $^1\text{O}_2$ durch Addition ab. Tocopheryl-Radikale werden mit einem Ascorbat-abhängigen Redoxsystem wieder regeneriert. (Kelly et al., 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999)

Der Plasmaspiegel liegt etwa bei 10mg/l (Diem et al., 1975). Vitamin E besitzt wie Vitamin C durch Reduktion von Metallionen *in vitro* auch prooxidative Eigenschaften (Halliwell & Gutteridge, 1999).

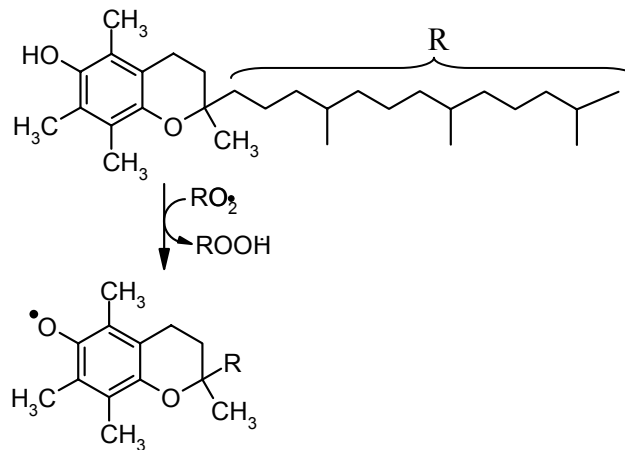


Abbildung 2.4: Reaktion eines Peroxyl-Radikals mit α -Tocopherol und das entstehende Tocopheryl-Radikal (nach Belitz et al., 1992)

Viele pflanzliche, farbgebende **Phenole** gelten als Antioxidantien, da sie nach Wasserstoffabstraktion resonanzstabilisierte Radikale bilden und auch mit Metallionen Chelat-Komplexe eingehen (Hollmann et al., 1999). Obst- und Gemüsesäfte gelten daher als antioxidativ wirksame Lebensmittel.

Beispiele für Phenole und deren Vorkommen sind in Tabelle 2.4 und Abbildung 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.4: Einige Quellen pflanzlicher Phenole (nach Hollmann et al., 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999)

Pflanzliche Phenole	Hauptvorkommen
Flavone	Petersilie, Stangensellerie, Thymian
Flavonole	Zwiebeln, Beeren, Brokkoli, Apfel, Kirschen, Tee, Rotwein
Flavanone	Zitrusfrüchte
Flavanole	grüner & schwarzer Tee, Rotwein
Catechine	Apfel, Tee
Anthocyanidine	rote Trauben, Rotwein, Kirschen, Himbeeren, Erdbeeren
Isoflavone	Sojabohnen, Leguminosen

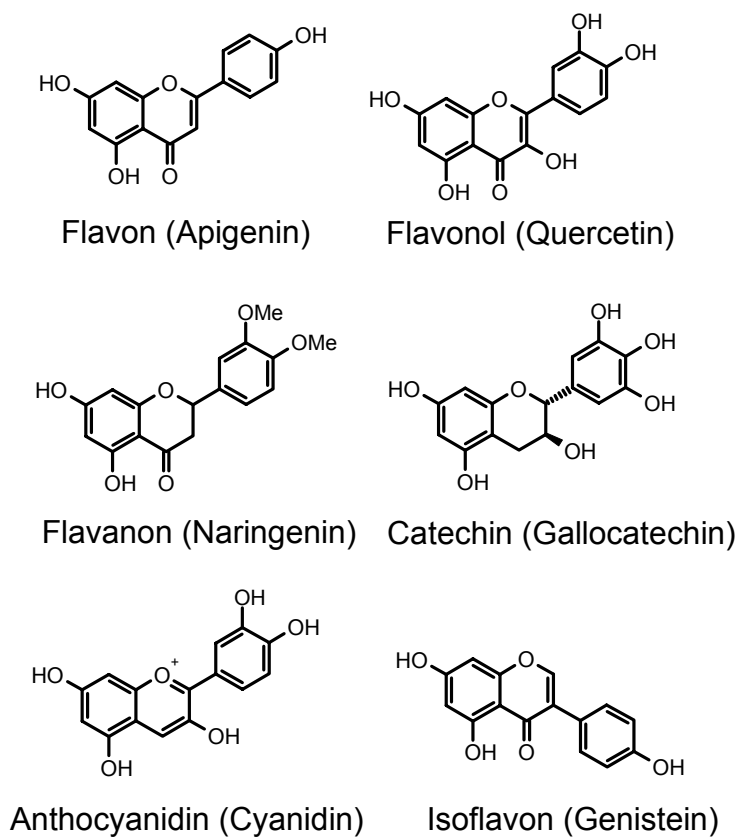


Abbildung 2.5: Strukturen einiger pflanzlicher Phenole (nach Belitz et al., 1992; Eisenbrand et al., 1995a)

Bilirubin ist das Endprodukt des Hämabbaus und hat eine intensiv gelbe Farbe. Es liegt im Plasma hauptsächlich albumingebunden in Gesamtkonzentrationen von 3-21 μM vor (Fresenius Kabi, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999). *In vitro* wurde gezeigt, dass Bilirubin Peroxyl-Radikale und $^1\text{O}_2$ abfangen kann. So kann es sowohl Albumin als auch albumingebundene Fettsäuren schützen. Die Bedeutung *in vivo* ist allerdings noch unklar (Stryer, 1996; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Harnsäure (s. Abbildung 2.6) wird durch Xanthin-Oxidase aus Hypoxanthin oder Xanthin im Zuge des Purinabbaus gebildet. In vielen Spezies (nicht in Menschen und in Primaten) wird sie über Allantoin zu Harnstoff und Glyoxylat abgebaut. Im Menschen liegt Harnsäure normalerweise in Plasmakonzentrationen von 119-357 μM vor (Fresenius Kabi, 1999).

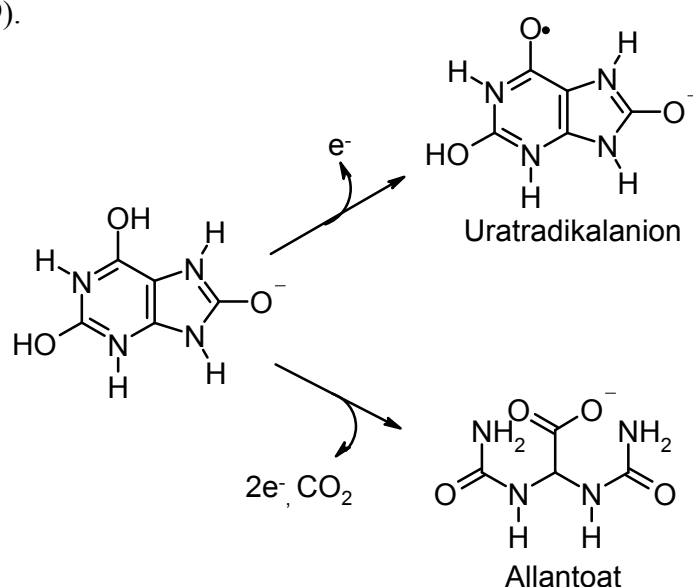


Abbildung 2.6: Harnsäure und Radikalabbauprodukte (nach Becker, 1993)

Harnsäure ist aufgrund seines Reduktionspotentials (pH 7) von 0,59V und der hohen Konzentration im Plasma ein gutes Antioxidanz. Sie bildet nach Abfangen von bzw. Oxidation durch ROS ein resonanzstabilisiertes Uratradikalanion, das nicht mehr zu einer Wasserstoffabstraktion fähig ist. Durch Abgabe von zwei Elektronen kann Harnsäure zum Allantoat oxidiert werden (s. Abbildung 2.6), das dann in Harnstoff und Oxalsäure gespalten wird. (Becker, 1993; Stryer, 1996)

Die Thiolgruppe des Tripeptids **GSH** (Gly-Cys- γ Glu, s. Abbildung 2.7) besitzt ebenfalls eine antioxidative Wirkung. GSH reduziert eine Reihe ROS ($^1\text{O}_2$, OH^\bullet , O_2^\bullet) und wird dabei zu GSSG oxidiert. Intrazellulär beträgt der Anteil von GSH am Gesamtglutathion

(tGSH: GSH + GSSG) etwa 90% (GSH-Status). Diese Homöostase wird durch die GSR aufrecht erhalten. Eine Senkung dieses GSH-Status oder eine GSH-Depletion kann durch starken oxidativen Stress verursacht werden oder eben diesen zur Folge haben. (Kelly et al., 1998)

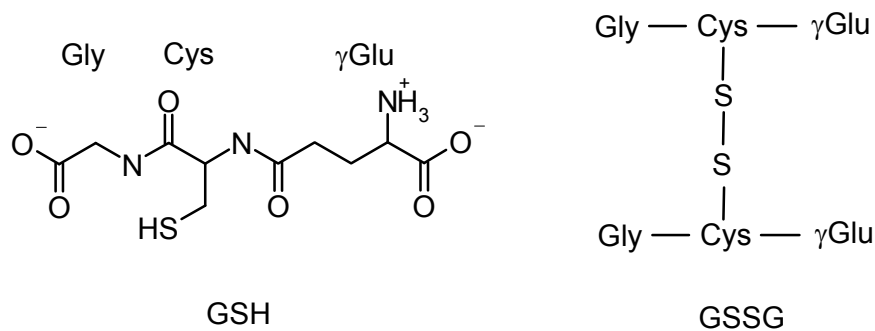


Abbildung 2.7: Struktur von reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG, nach Halliwell & Gutteridge, 1999)

Reaktive Elektrophile wie Aldehyde werden durch Umsetzung mit der Thiol-Gruppe von GSH deaktiviert und können GSH so depletieren. Diese Reaktion kann direkt bzw. nicht-enzymatisch oder durch eine Glutathion-S-Transferase vermittelt ablaufen (s. Abbildung 2.8). (Eisenbrand et al., 1995b; Glaab et al., 2001; Janzowski et al., 2000; Halliwell & Gutteridge, 1999)

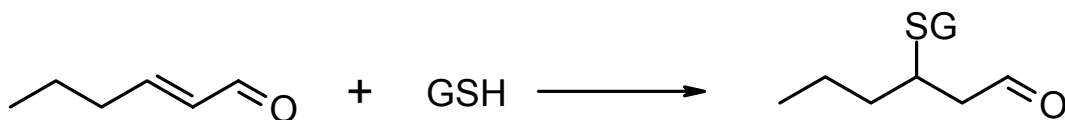


Abbildung 2.8: Beispiel für Reaktion von GSH mit einem reaktiven Aldehyd (2-Hexenal) (nach Glaab, 2001; Eisenbrand et al., 1995b)

Im Blut ist besonders viel GSH enthalten, da hier mit den O₂-transportierenden Erythrozyten besonders gefährdete Zellen vorliegen. Vollblut enthält 1-2mM GSH, wobei im Plasma nur 1-3µM vorhanden sind. Dies bedeutet, dass sich nahezu die gesamte Menge in den Blutzellen befindet. (Halliwell & Gutteridge, 1999; Ross et al., 1997; Ceballos-Picot et al., 1996; Ozden et al., 2002; Pasaoglu et al., 1996)

2.3 Lipidperoxidation

Lipide spielen in Organismen eine wichtige Rolle als Bestandteile zellulärer Membranen. Deshalb kann eine starke oxidative Schädigung der Lipide zu pathologischen Folgen führen. Die Oxidation von Lipiden (Lipidperoxidation, LPO) verläuft als radikalische Kettenreaktion und wird in drei Phasen eingeteilt: Initiation, Kettenverlängerung und Termination (s. Abbildung 2.9 und Abbildung 2.10). Die Kettenreaktion wird gestartet durch reaktive Spezies, die ein Wasserstoffatom von einer Methylengruppe abstrahieren können (Initiation). OH^\bullet -Radikale starten Kettenreaktionen mit allen Fettsäuren, wohingegen O_2^\bullet nur mit einigen, besonders aktivierten Fettsäuren reagiert (Halliwell & Gutteridge, 1999). Hierzu zählen mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit bis-allylischen Methylen-Gruppen. An diesen Stellen besitzen die Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen niedrige Dissoziationsenergien, so dass Wasserstoffabstraktionen durch Radikalreaktionen leicht möglich sind (Kelly et al., 1998). Es entstehen Alkyl- und Peroxyl-Radikale, die dann mit weiteren Fettsäuren reagieren (Kettenverlängerung). Die Radikalkettenreaktion verzweigt durch Zerfall von Peroxiden, aus denen dann je zwei Radikale entstehen. Ein Kettenabbruch geschieht durch Reaktion der Radikale mit Molekülen, die dann stabile Produkte bilden (Termination). (Belitz et al., 1992; Kelly et al., 1998)

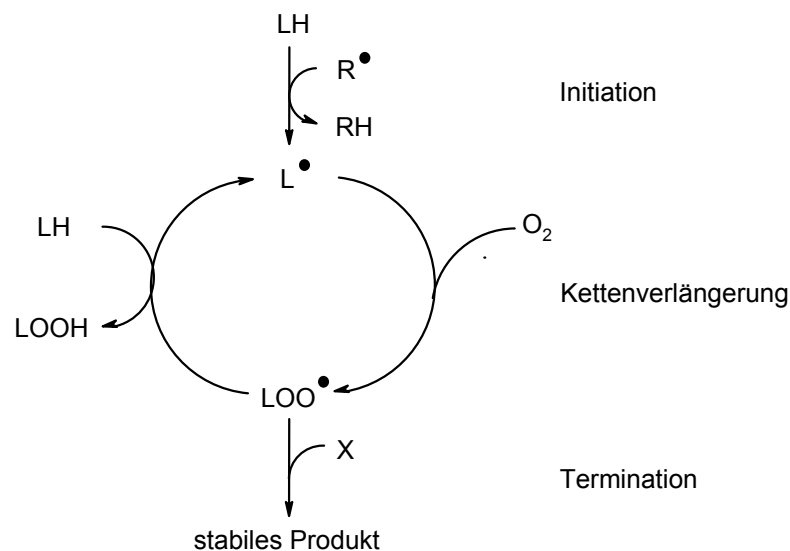


Abbildung 2.9: Überblick über die Lipidperoxidation (nach Kelly et al., 1998); LH: Fettsäure; L^\bullet : Alkyl-Radikal; LOO^\bullet : Alkyl-Peroxyl-Radikal; LOOH: Alkylhydroperoxid; R^\bullet : reaktive Spezies; X: Molekül, mit dem LOO^\bullet abreagiert

Während der LPO und der damit verbundenen Fragmentierung entstehen verschiedenste, gesättigte als auch ungesättigte Moleküle wie z. B. Alkane, Aldehyde, Ketone und Furane (Belitz et al., 1992). Neben Eigenschaften als Aromakomponenten können diese reaktiven Mole-

können auch zytotoxische, genotoxische und mutagene Wirkungen besitzen (Marnett, 1999). Sie reagieren mit Proteinen und DNA und schädigen so zelluläre Bestandteile (s. Kapitel 2.4).

Als Beispiel für ein LPO-Produkt soll die Entstehung von Malondialdehyd (MDA) erläutert werden:

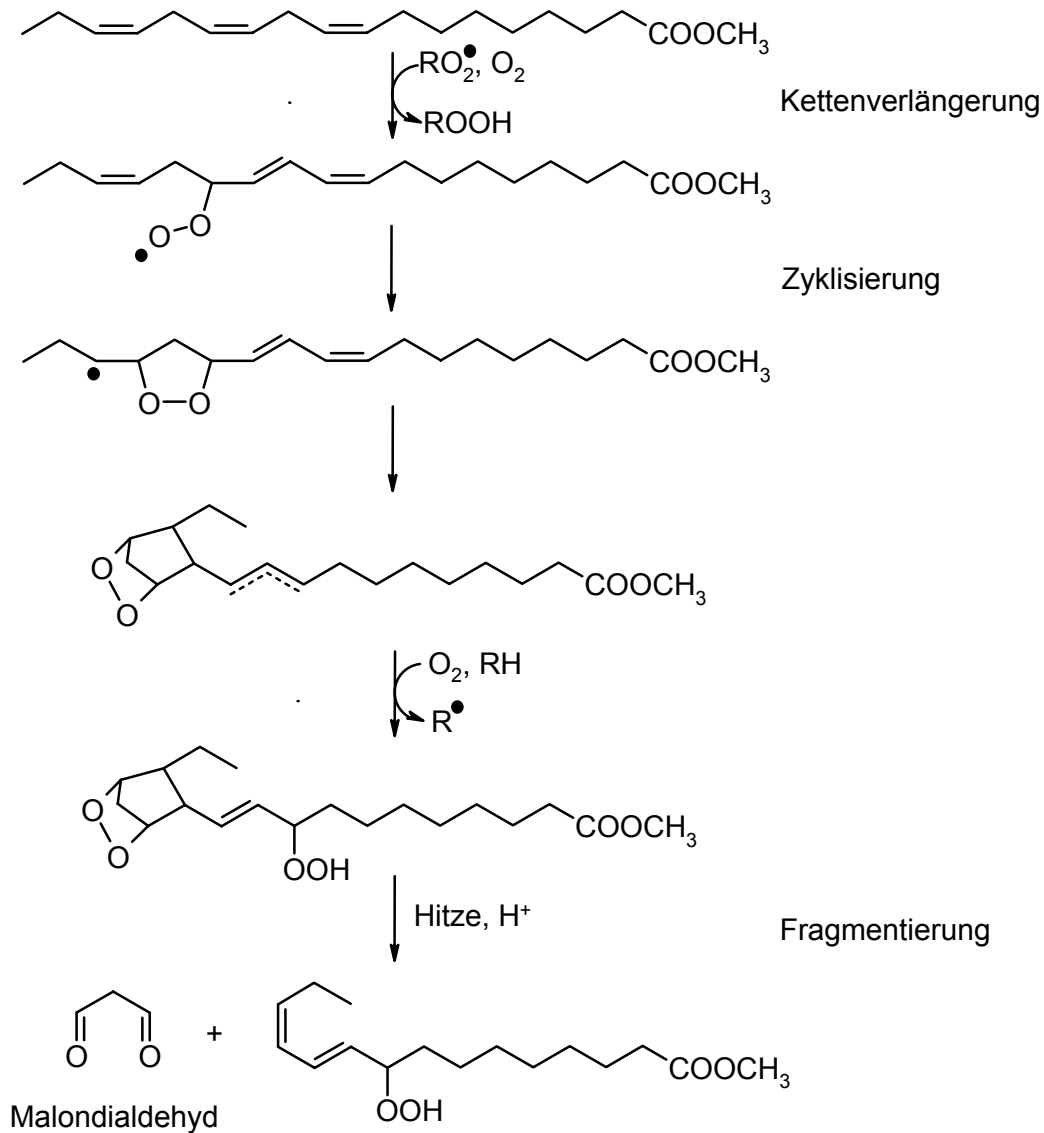


Abbildung 2.10: Entstehung von MDA aus α -Linolensäure (nach Belitz et al., 1992)

MDA entsteht aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Reaktion mit einem Peroxyl-Radikal und O_2 , nachfolgender Zyklisierung und Fragmentierung (s. Abbildung 2.10). Dies geschieht zum einen durch oxidativen Stress in Lipidmembranen, aber auch bei der enzymkatalysierten Umsetzung von Eicosanoiden (Janero, 1990; Esterbauer et al., 1991). Des Weiteren wird MDA auch gebildet durch die Myeloperoxidase aus aktivierten Neutrophilen bei

Entzündungen (Marnett, 1999) und durch ROS-Angriff des Zucker-Phosphat-Rückgrates der DNA (s. Abbildung 2.15).

MDA besitzt zwei Aldehyd-Gruppen oder als Enolat eine α,β -ungesättigte Carbonylstruktur (s. Kapitel 2.4) und ist deshalb hochreaktiv und bindet an DNA und Proteine (Esterbauer et al., 1991).

MDA und andere Aldehyde werden häufig als Marker für LPO herangezogen, indem sie nach Umsetzung mit Thiobarbitursäure als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) photometrisch bestimmt werden (s. Kapitel 2.9.3). Ein spezifischer Nachweis von MDA gelingt durch chromatographische Trennung der TBARS per HPLC und Fluoreszenz-Detektion (Janero, 1990).

Andere Moleküle, die ausschließlich durch LPO entstehen und sich somit als LPO-Marker besser eignen, sind die Isoprostane. Sie ähneln strukturell dem Prostaglandin $\text{PGF}_{2\alpha}$ und werden während der Peroxidation der Arachidonsäure gebildet (s. Abbildung 2.11). Die F_2 -Isoprostane werden mit immunchemischen Methoden oder nach Derivatisierung gaschromatographisch bestimmt. Dies ist verglichen mit der HPLC-Bestimmung von MDA wesentlich aufwendiger. (Halliwell & Gutteridge, 1999)

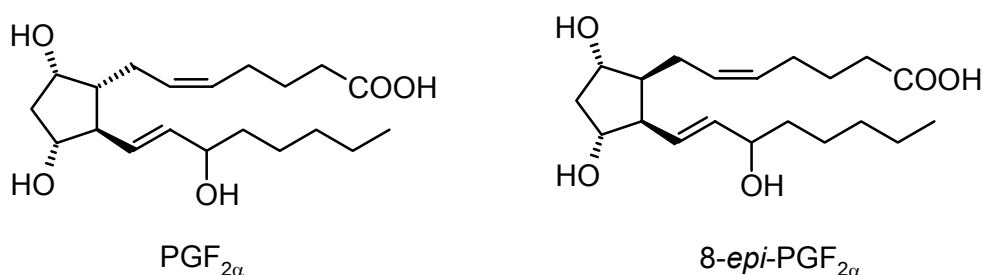


Abbildung 2.11: Prostaglandin $\text{PGF}_{2\alpha}$ und das stereochemisch verwandte Isoprostan $8\text{-}epi\text{-PGF}_{2\alpha}$ (nach Halliwell & Gutteridge, 1999)

2.4 DNA-Schädigung und Reparatur

Viele Publikationen deuten auf einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Krebsentstehung hin. Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen liegt nicht nur bei einer direkten Schädigung der DNA, sondern auch auf einer Beeinflussung der Zellproliferation, der Signaltransduktion, dem Zelltod und der interzellulären Kommunikation (Halliwell & Gutteridge, 1999; Klaunig et al., 1998; Loft et al., 1996).

Von den ROS ist OH^\bullet für die meisten DNA-Schäden verantwortlich, wohingegen Peroxyl-Radikale und H_2O_2 nicht direkt mit der DNA reagieren. Der Angriff von OH^\bullet an den Basen führt zu unterschiedlichen Hydroxylierungen, Ringöffnungen und Fragmentierungen (s. Abbildung 2.12). Daraus entstehen dann eine Vielzahl von Sekundärprodukten. Außerdem wird auch direkt das Zucker-Phosphat-Rückgrat geschädigt, was zu DNA-Strangbrüchen führt. (Kelly et al., 1998)

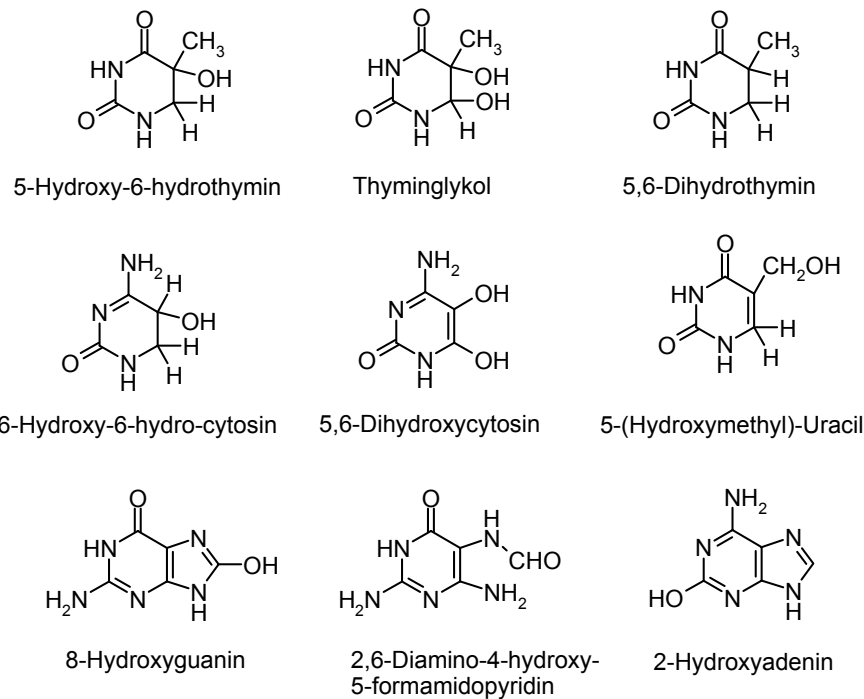


Abbildung 2.12: Beispiele für oxidierte Pyrimidine und Purine (nach Laval, 1996)

OH^\bullet generiert eine Vielzahl verschiedener Produkte: es oxidiert z. B. Guanin in 4-, 5- oder 8-Position (8-Oxo-desoxyguanin oder 8-Hydroxy-desoxyguanin, 8-OH-dG) des Purinrings, die zu ringgeöffneten Produkten wie 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPy) weiterreagieren (s. Abbildung 2.13). Ein Angriff an Pyrimidinen führt, neben den auch möglichen Oxidationsprodukten, zu Basendimeren. (Halliwell & Gutteridge, 1999; Kelly et al., 1998; Jaruga et al., 1996)

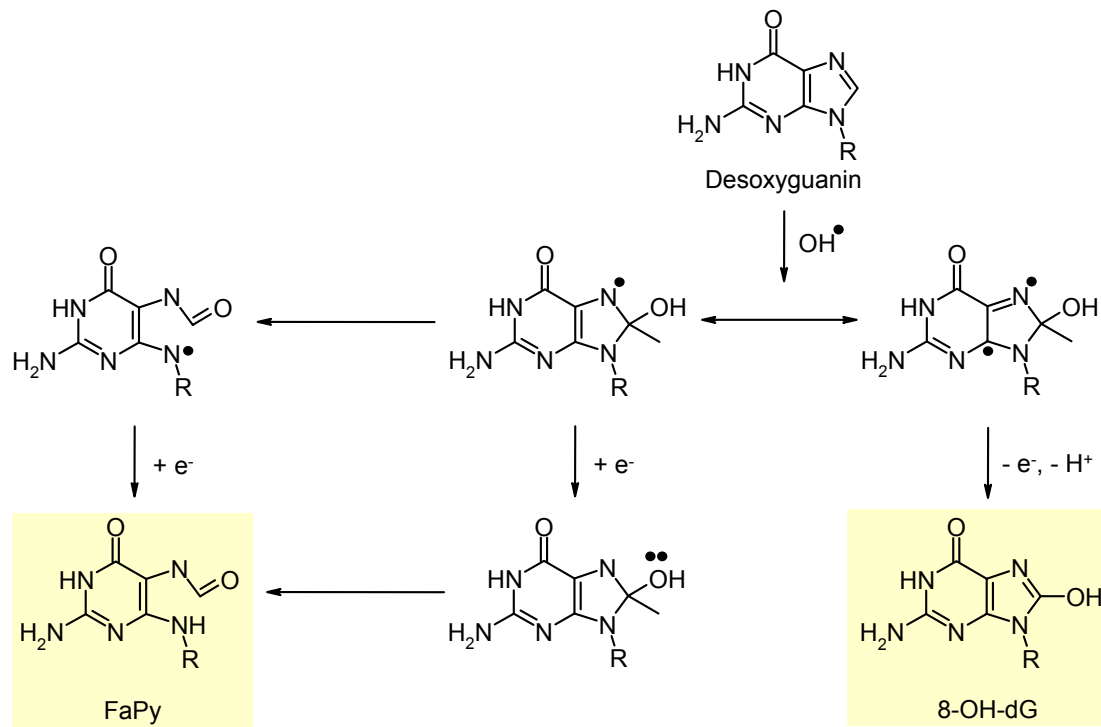


Abbildung 2.13: Modifikationen von Desoxyguanin durch OH^\bullet -Radikale (nach Halliwell & Gutteridge, 1999)

Derartige DNA-Schädigungen induzieren die Initiation einer Reparaturkaskade. Bei der Basen-Ausschneide-Reparatur („Base Excision Repair“) wird die fehlgepaarte Base erkannt, eine abasische (apurine/apyrimidine, AP-) Stelle erzeugt (DNA-Glykosylase) und ein Strangbruch eingeführt (Endonuklease). Anschließend wird durch eine Polymerase die Desoxyribose herausgeschnitten und das neue, korrekte Nukleotid eingeführt. Eine Ligase schließt die Lücke wieder. Die Nukleotid-Ausschneide-Reparatur („Nucleotid Excision Repair“) funktioniert ähnlich, ist aber aufwendiger, da das herausgeschnittene Stück etwa 30 Basen lang ist. Wenn der Schaden nicht erkannt und repariert wird, kann es bei der Replikation zu Basenfehlpaarungen kommen. Je nach Basenmodifikation entstehen Transversionen oder Transitionen, die zu Mutationen führen können. (Hoeijmakers, 2001; Halliwell & Gutteridge, 1999)

Auch die während der LPO entstehenden Produkte können mit der DNA z. B. zu Etheno- oder Propano-Addukten reagieren, wie hier am Beispiel MDA gezeigt werden soll:

MDA reagiert mit den Basen dC, dA und dG u. a. zu M₁dC, M₁dA und dem Propano-Addukt M₁dG (s. Abbildung 2.14, Benamira et al., 1995).

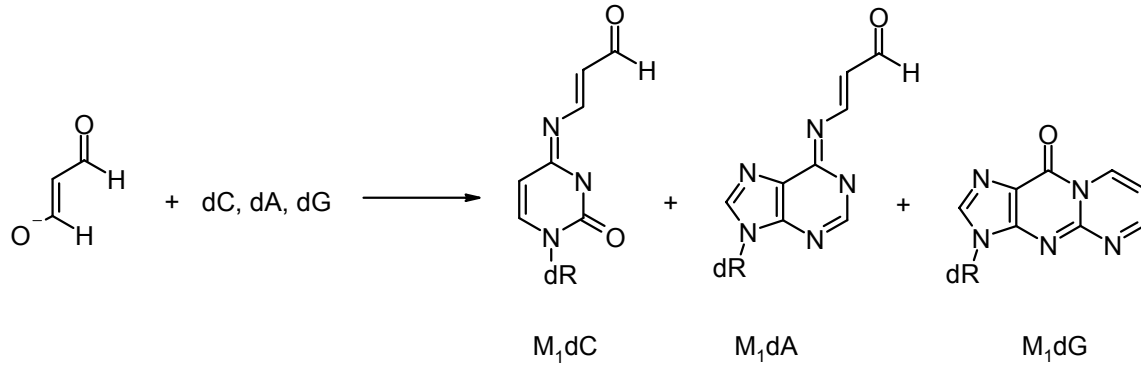


Abbildung 2.14: Strukturen von MDA-DNA-Addukten (nach Benamira et al., 1995)

Ein anderer, LPO-unabhängiger Weg zu M₁dG und anderen MDA-Addukten führt über einen Radikalangriff am DNA-Zuckerrückgrat in C-4'-Position. Aus dem entstehenden „Basen-Propenal“ kann MDA effektiv auf dG übertragen werden (s. Abbildung 2.15). Dedon et al. (1998) zeigten, dass die M₁dG-Konzentration nach Inkubation eines definierten DNA-Stücks mit Adenin-Propenal höher als nach Inkubation mit MDA war. M₁dG führt bei der Replikation zu Basenfehlpaarungen und ist deshalb als prämutagene Läsion anzusehen. (Benamira et al., 1995; Dedon et al., 1998; Marnett, 1999)

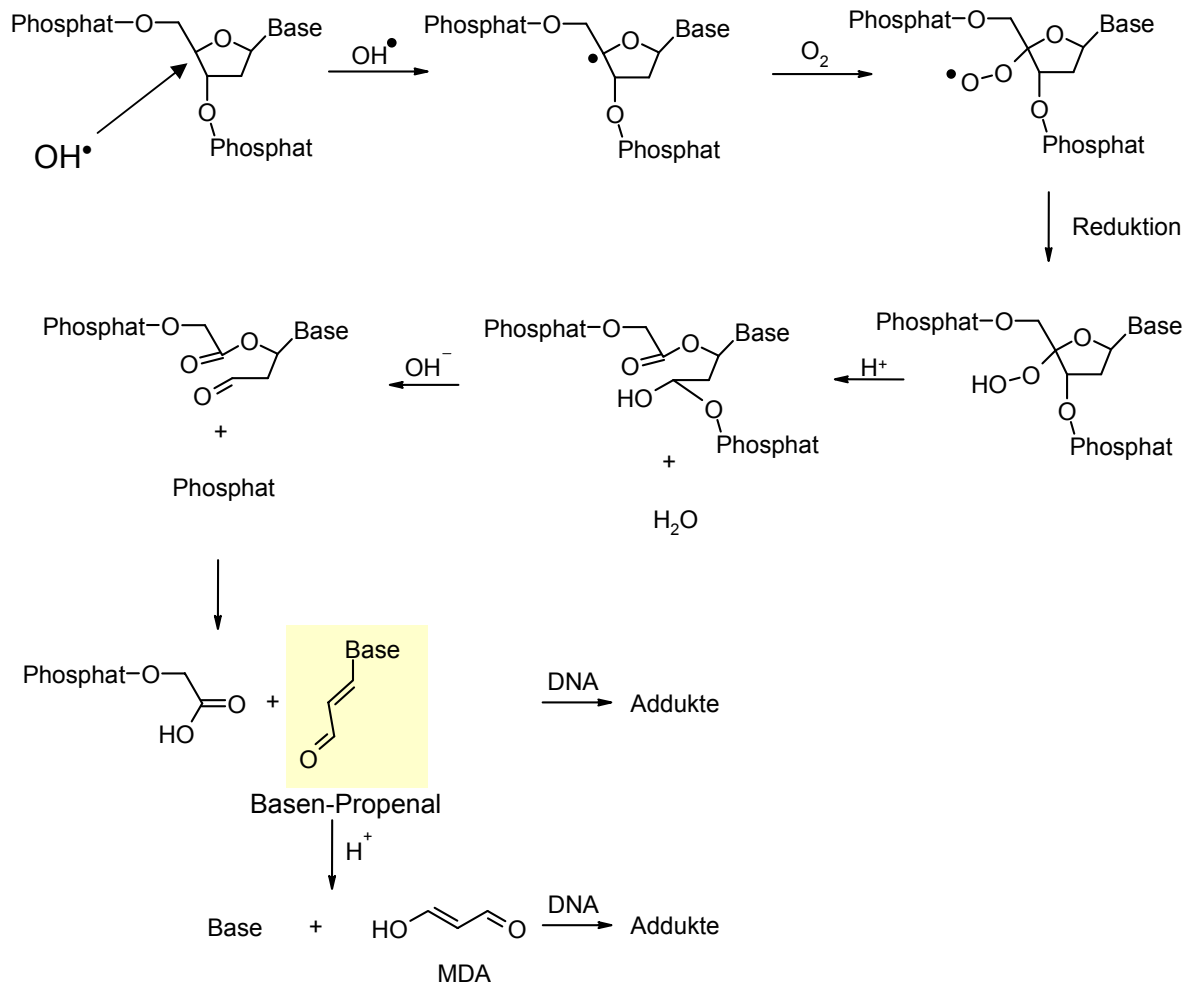


Abbildung 2.15: Bildung von MDA und MDA-Addukten durch Reaktion von OH• mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA (nach Janero, 1990; Dedon et al., 1998)

2.5 Oxidativer Stress und Krankheiten

Oxidativer Stress wird für über 100 Krankheiten als Ursache oder zumindest als krankheitsbegleitend beschrieben (s. Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Beispiele für Krankheiten und Faktoren, bei denen ein Zusammenhang mit oxidativem Stress diskutiert wird (nach Halliwell & Gutteridge, 1999; Dandona et al., 1996; Collins, 1999)

Kategorie	Beispiel
entzündlich	Glomerulonephritis, Autoimmunkrankheiten, Diabetes, Hepatitis
Eisen-Überladung	Hämochromatose, Thalassämie
Respirationstrakt	Zigarettenrauch, Luftschadstoffe
Auge	Katarakt
Haut	UV-Strahlung, Hitze, Krebs
Herzkreislaufsystem	Atherosklerose, Anthracyclin-Kardiotoxizität
Niere	Autoimmun-Nephrotisches Syndrom, Hämodialyse, Transplantation

Zu oxidativem Stress bei Erkrankungen kann es durch

- a) verminderte antioxidative Abwehr (z. B. durch Depletion von Antioxidantien, Mutationen in Genen für antioxidative Enzyme) und durch
- b) erhöhte Produktion von ROS (z. B. erhöhte O₂-Exposition, exzessive Aktivierung von ROS-produzierenden Systemen) kommen.

Zur Verminderung des oxidativen Stresses wurde bei vielen der in Tabelle 2.5 genannten Krankheiten/Faktoren eine Prävention oder Therapie u. a. mit Antioxidantien versucht (Übersicht in McCall et al., 1999). Eine Reduktion des oxidativen Stresses erscheint aber auch bei gesunden Menschen hinsichtlich einer langfristigen Vorbeugung gegenüber Krebs und anderen Krankheiten sinnvoll (Halliwell & Gutteridge, 1999). Am Einfachsten erfolgt dies durch die Aufnahme von protektiven Stoffen über die Ernährung (z. B. Vitamine, pflanzliche Phenole über Obst, Gemüse oder Säfte) oder über Nahrungsergänzungsmittel.

Ein viel versprechender Mischfruchtsaft wurde von Prof. Dr. Dietrich, Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Weinanalytik und Getränkforschung, hergestellt, der durch Sortenauswahl (alte Sorten, Wildfrüchte) und technologische Verfahren besonders hohe Flavonoid-/Polyphenolgehalte aufweist (Dietrich, 2000). Dieser Saft besteht aus 30% weißem Trauben-, 25% schwarzem Johannisbeer-, 15% Holunder-, 10% Brombeer-, 10% Sauerkirsch- und 10%

Aroniasaft mit einem Gesamtpolyphenolgehalt von über 2500mg/l (nach Folin, berechnet als Catechin) und einer außerordentlich hohen antioxidativen Kapazität.

Erste Interventionsversuche mit 400ml dieses Mischfruchtsaftes zeigten innerhalb 12 Stunden im Plasma der Versuchspersonen eine Zunahme der antioxidativen Kapazität und eine Abnahme des MDA-Gehaltes (Netzel et al., 2002).

Bei einer Intervention können allerdings auch negative Effekte auftreten: Zwei Studien zur Krebsprävention bei Rauchern fanden höhere Inzidenzen für Lungenkrebs in der Gruppe, die täglich das antioxidativ wirksame β -Carotin einnahm (Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994; Omenn et al., 1996).

2.6 Nieren, Niereninsuffizienz, Hämodialyse und oxidativer Stress

Die sehr gut durchbluteten Nieren sind im menschlichen Körper für die Kontrolle der extrazellulären Flüssigkeit und des Volumens des Blutes verantwortlich, das etwa 60mal pro Tag hindurchgeschleust wird. In den Nieren werden circa $\frac{1}{5}$ des Blutplasmas durch Filtration im Glomerulus von Makromolekülen und Blutzellen abgetrennt und in den sich anschließenden Tubulusgefäßen essentielle Moleküle wie Wasser, Elektrolyte, Vitamine und Aminosäuren resorbiert. Die Nieren halten somit den Wasser- und Elektrolythaushalt konstant, regulieren den Säure-Basen-Haushalt und scheiden harnpflichtige Stoffwechselprodukte wie Harnsäure und Oxalat aus. Dadurch spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Einstellung des Blutdrucks. Des Weiteren produzieren die Nieren Hormone wie Erythropoietin (EPO) und greifen so in die Blutbildung regulierend ein. (Hildebrandt et al., 1993; Sarre et al., 1988; Schönweiß, 1998)

Menschen, deren Nieren keine ausreichende Eliminationsfähigkeit mehr besitzen (terminale Niereninsuffizienz, Urämie), werden mit streng bilanzierten Diäten (z. B. beschränkte Aufnahme von Wasser und bestimmten Ionen) und Nierenersatzverfahren wie Hämodialyse (HD) oder Nierentransplantation therapiert.

Die HD ist mit weltweit jährlich etwa 90 Millionen Anwendungen die am häufigsten durchgeführte Behandlung zur Nierenersatztherapie (Clark et al., 2002). Hierbei wird arterielles Blut mit Schläuchen und Schlauchpumpen zu einem Dialysegerät (extrakorporaler Blutkreislauf) geführt und dabei gereinigt, bevor es wieder in den Körper zurückgeführt wird (s. Abbildung 2.16). In diesem Dialysegerät findet ein Stoffaustausch durch Diffusion über eine semipermeable Dialysatormembran, die das Patientenblut von einer gepufferten Elektrolytlösung (Dialy-

sat) trennt, statt (s. blauer Rahmen in Abbildung 2.16). Um die treibende Kraft (Konzentrationsgefälle) zwischen den Flüssigkeiten möglichst groß zu halten, werden Blut (200-300ml/min) und Dialysat (ca. 500ml/min) im Gegenstrom geführt und das Dialysat nach einem Durchfluss verworfen. Die Stoffe diffundieren passiv von der Flüssigkeit mit hoher zu der mit niedriger Konzentration. Allerdings passieren nur Stoffe den Dialysator, deren Molekulargewicht kleiner als die Ausschlussgrenze der Membran ist.

Auf diese Weise werden Urämietoxine aus dem Blut entfernt und ein Elektrolyt- und Säure-Basen-Ausgleich zwischen Blut und dem gepufferten Dialysat erreicht. Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz werden in der Regel dreimal pro Woche für vier bis fünf Stunden hämodialysiert. (Sarre et al., 1988)

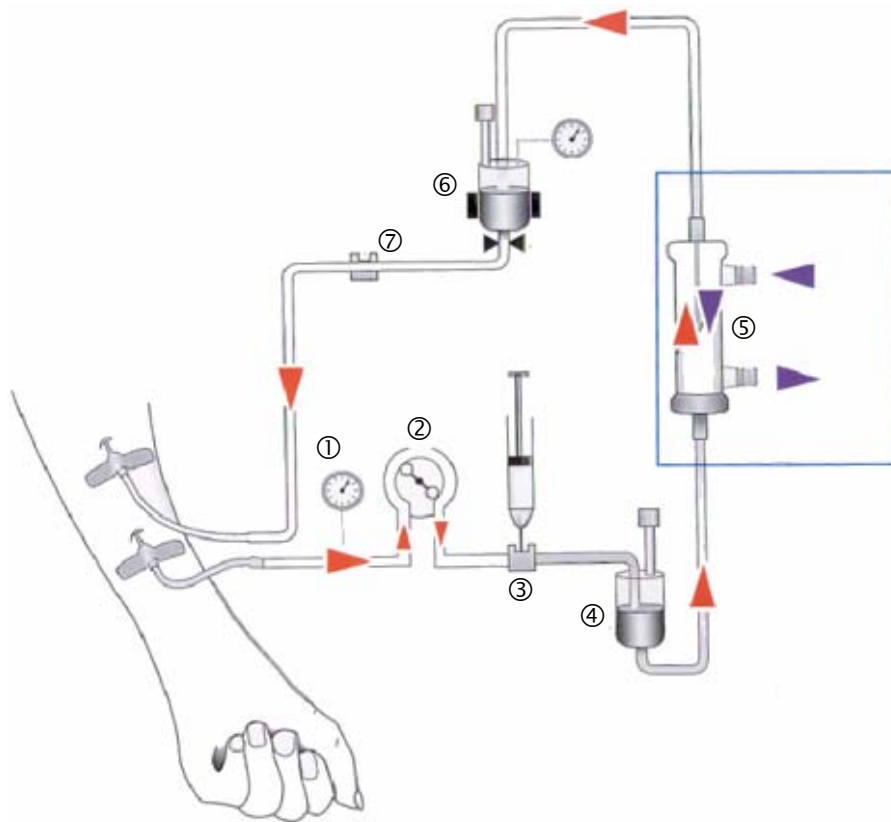


Abbildung 2.16: Schematischer Aufbau eines Dialysegerätes (Schönweiß, 1998): nach Austritt aus dem Körper wird das Blut durch einen Druckmesser ①, eine Schlauchpumpe ②, eine Heparinzufuhrstelle ③ und Blasenfänger ④ zum Dialysator ⑤ befördert. Anschließend gelangt es über einen Blasenfänger ⑥ und eine Infusionsstelle ⑦ wieder zurück in den Körper.

Die für die Urämie verantwortliche Grunderkrankung Niereninsuffizienz kann verschiedene Ursachen haben: (Sarre et al., 1988; Schönweiß, 1998; Schiffel et al., 1999)

- (a) glomeruläre Erkrankungen: pathomorphologische Veränderungen in den Nierenkörperchen sind häufig die Folge von Autoimmunreaktionen.

- (b) interstitielle und tubuläre Erkrankungen werden meist durch Bakterien oder Medikamente verursacht.
- (c) vererbte Nierenerkrankungen.
- (d) Bluthochdruck und atherosklerotische Veränderungen können die Gefäße der Nieren verändern und so eine Urämie auslösen.
- (e) sekundäre Nierenerkrankungen werden durch primär-extrarenale Erkrankungen wie Diabetes mellitus verursacht. Diabetiker stellen einen großen Teil (bis zu 40%) der HD-Patienten, nach 10 bis 15 Jahren nach Erkrankungsbeginn sind etwa 50% der Patienten dialysepflichtig.

Als Einflussfaktoren für den erhöhten oxidativen Stress der Patienten werden bioinkompatible Dialysatoren (s. Kapitel 2.6.1), die Behandlung der renalen Anämie (s. Kapitel 2.6.2) und verschiedene dialysebedingte Begleitumstände diskutiert:

- (a) Während der HD werden niedermolekulare Antioxidantien aus dem Blut entfernt oder durch den oxidativen Stress verbraucht. Dadurch wird die antioxidative Abwehr geschwächt (Canaud et al., 1999; Galli et al., 2000).
- (b) Eine Mangel- oder Fehlernährung mit einer proteinreduzierten Diät führt zu entzündungsähnlichen Reaktionen im Körper (Kaysen, 2001); die einzuschränkende Kaliumzufuhr bedingt einen geringen Obstverzehr und somit eine geringe Aufnahme von Vitamin C und pflanzlichen Phenolen (Hasselwander et al., 1998).
- (c) Advanced Glycation Endproducts (AGE), Reaktionsprodukte aus Zuckern und Proteinen (z. B. Pentosidine, s. Abbildung 2.17), werden auch bei nicht-diabetischen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz gebildet. Aufgrund ihrer Größe werden die AGE's bei der HD aber nur unzureichend eliminiert und aktivieren über spezifische Rezeptoren (RAGE) Makrophagen und Endothelzellen. Diese beiden Zelltypen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose, die bei diesen Patienten gehäuft auftritt. (Kaysen, 2000; Boaz et al., 2001; Hasselwander et al., 1998; Weiss, 1999; Vlassara et al., 2002; Raj et al., 2000; Nawroth et al., 1999; Miyata et al., 2000)

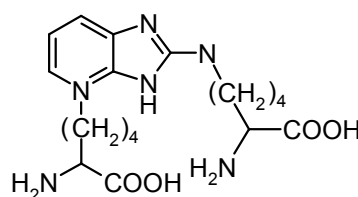


Abbildung 2.17: Beispiel für ein AGE: Pentosidin aus einer Pentose, Lysin und Arginin (nach Belitz et al., 1992)

- (d) Endotoxine aktivieren das Immunsystem durch mikrobiologische Kontaminationen des Dialysates (Canaud et al., 1999; Kaysen, 2001).
- (e) HD-Patienten erkranken aufgrund der beanspruchten Immunabwehr häufig an bakteriellen Infektionen wie Lungenentzündungen (Canaud et al., 1999).

Dieser erhöhte oxidative Stress zeigt sich bei zahlreichen biochemischen Endpunkten, die bei den Patienten vor Beginn einer HD im Vergleich zu gesunden Menschen bereits signifikant verändert sind (s. Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Übersicht verschiedener Endpunkte, die im Blut von HD-Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen verändert sind (↑: Erhöhung in HD-Patienten; ↓: Erniedrigung in HD-Patienten)

Marker	Veränderung	Literatur
TEAC	↑	Jackson et al., 1995
GSSG, GSH, SOD, GSR	↓	Ceballos-Picot et al., 1996;
GSH, GPx, SOD	↓	Eiselt et al., 2001
SOD, GPx	↑	Eiselt et al., 2000
GSH, GSR, GPx	↓	Pasaoglu et al., 1996
SOD, CAT, GPx, Vitamin E	↓	Dursun et al., 2002
GSH	↓	Ozden et al., 2002; Ross et al., 1997; Tarng et al., 2000a
GSSG	↑	Tarng et al., 2000a
Vitamin C	↓	Clermont et al., 2000; Jackson et al., 1995; Tarng et al., 2000a
Ascorbyl-Radikale	↑	Clermont et al., 2000
TBARS, MDA	↑	Donica, 2001; Eiselt et al., 2001; Gerardi et al., 2002; Jackson et al., 1995; Sommerburg et al., 2000; Usberti et al., 1999; Weinstein et al., 2001; Ikizler et al., 2002
F ₂ -Isoprostane	↑	Handelman, 2000; Handelman et al., 2001; Ikizler et al., 2002
Mikrokerne	↑	Stopper et al., 1999
DNA-Strangbrüche	↑	Stopper et al., 2001; Kan et al., 2002
8-OH-dG	↑	Tarng et al., 2000a

Auch während der HD ändern sich zahlreiche Marker. So wurden im Verlauf der HD signifikante Modulationen von CAT, SOD, GSH, MDA, Vitamin C und Harnsäure festgestellt. (Us-

berti et al., 2002a; Jackson et al., 1995; Gerardi et al., 2002; Daschner et al., 1996; Ha et al., 1996; Roob et al., 2000)

2.6.1 Dialysemembranen

Die gebräuchlichste Dialysatorform ist der Hohlkörperdialysator. Er besitzt in seinem zylindrischen Gehäuse etwa 10.000 Kapillaren, die die eigentliche Dialysemembran mit einer Gesamtfläche von 1,5-1,8m² darstellen. Die Oberfläche beeinflusst entscheidend die Eliminationsfähigkeit der Membran. Die Kapillaren haben einen Innendurchmesser von bis zu 200µm, eine Wandstärke von 5-40µm und einen mittleren Porendurchmesser von 0,003µm. Leukozyten haben im Vergleich dazu einen Durchmesser von 10-15µm, Erythrozyten die Maße 8,5×2µm.

Die Dialysemembranen bestehen aus Cellulose, modifizierter Cellulose oder synthetischen Materialien z. B. Polysulfon (PSu), Polyacrylnitril, Polymethylmethacrylat (PMMA, s. Abbildung 2.18).

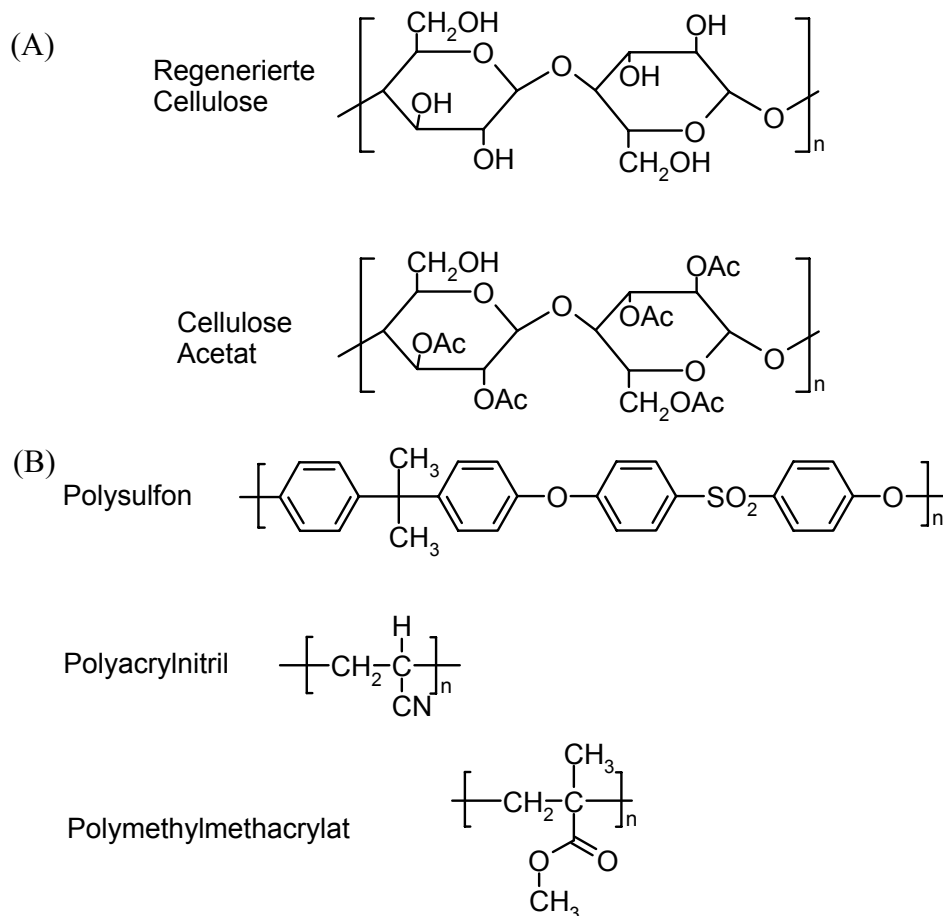


Abbildung 2.18: Verschiedene Dialysemembranmaterialien: (A) Modifizierte Cellulosemembranen werden durch Derivatisierung der Hydroxylgruppen mit Acetat- (Ac) Gruppen hergestellt; (B) synthetische Membranen (Bowry, 2002)

Ein entscheidendes Kriterium für die Qualität einer Dialysemembran ist neben der Entfernung von Stoffwechselprodukten die Biokompatibilität der HD-Membran, worunter man das Ausbleiben von biologischen Reaktionen des menschlichen Organismus bei Kontakt von Blut oder Gewebe mit dem Fremdmaterial versteht. Diese strenge Definition der Biokompatibilität wird gegenwärtig von keiner Nierenersatztherapie erreicht. Durch den Kontakt von Blut mit dieser nicht-biologischen Oberfläche werden Thrombozyten aktiviert, die dann die Blutgerinnungskaskade in Gang setzen. Die Blutgerinnung muss durch eine ständige Heparinisierung verhindert werden. Die Aktivierung von Granulozyten bewirkt im Blut einen Anstieg von Myeloperoxidasen, ROS, Interleukinen und des Tumornekrosefaktors. Das Komplementsystem wird ebenfalls durch den Membrankontakt aktiviert, wodurch eine Entzündungsreaktion imitiert wird. Als zentrale Größe zur Beurteilung der Biokompatibilität wird heute die Komplementaktivierung angesehen. (Sarre et al., 1988; Schifffl et al., 1999; Bowry, 2002)

Unmodifizierte Cellulose-Membranen (Cuprophane[®]) verursachen durch die Interaktion von Komplementfaktoren mit den vielen Hydroxylgruppen eine starke Aktivierung und sind somit als wenig biokompatibel anzusehen. Sie werden heute in dieser Form nahezu nicht mehr eingesetzt. Die Derivatisierung der Hydroxylgruppen z. B. mit zwei Acetat-Gruppen pro Glucose-Molekül (Baxter DICEA 170, s. Abbildung 2.18 A) vermindert die Interaktion mit den Komplementfaktoren und somit auch deren Aktivierung. Die Firma Terumo (Terumo E15, Japan) stellt mit Vitamin E und langkettigen, ungesättigten Alkoholen beschichtete Cellulosemembranen her. Diese Modifikation soll neben der geringeren Komplementaktivierung auch die durch Entzündungsreaktionen produzierten ROS vermindern. Synthetische Membranen (z. B. Fresenius F8 aus PSu) verursachen eine sehr geringe Immunreaktion und werden deshalb als sehr biokompatible Membranen angesehen. (Bowry, 2002; Clark et al., 2002; MacGinley et al., 2001)

Neben der Komplementaktivierung wurden auch zahlreiche Marker für oxidativen Stress untersucht und damit unterschiedliche Membranmaterialien meist in so genannten „Cross Over“-Studien (Wechsel der Patienten von Membran A zu Membran B) verglichen. Patienten, die mit synthetischen PSu-Membranen und Vitamin E-beschichteten Cellulosemembranen behandelt wurden, zeigten u. a. niedrigere Gehalte an MDA, Pentosidin, 8-OH-dG und oxidierten LDL im Vergleich zu Cellulosemembranen. (Buoncristiani et al., 1997; Jadoul et al., 1999; Tarnig et al., 2000b; Tsuruoka et al., 2002)

2.6.2 *Anämie in Verbindung mit Niereninsuffizienz*

Die fortschreitende Niereninsuffizienz ist mit Störungen von Organfunktionen und Regulationssystemen verbunden, was bei HD-Patienten an der Anämie (Blutarmut, Verminderung der Erythrozytenzahl und Hämoglobinkonzentration) deutlich wird. Das Hormon EPO, das im Knochenmark die Produktion von Erythrozyten anregt, wird in der Nierenrinde produziert, was bei HD-Patienten durch verschiedene Faktoren gestört ist. Auch die Lebenszeit von Erythrozyten ist bei diesen Patienten etwa um die Hälfte erniedrigt. Diese Effekte werden durch einen Eisenmangel, der auf einen ständigen Blutverlust durch die HD und die notwendige Diät zurückzuführen ist, verstärkt. (Hildebrandt et al., 1993; Sarre et al., 1988; Schönweiß, 1998)

Therapiert wird die Anämie durch EPO-Gabe. Da aber der Eisenmangel zum begrenzenden Faktor wird, muss Eisen in Form von Infusionen appliziert werden (Parrkinen et al., 2000). Als Eisenpräparate stehen u. a. Eisen(III)-Gluconat-Lösung (Ferrlecit[®]) und Eisen(III)-Hydroxid-Saccharose-Komplex-Lösung (Venofer[®]) zur Verfügung. Die Infusionsregime variieren sehr stark von monatlich, wöchentlich bis dialysetäglich, Infusion über die Dialysedauer (vier Stunden) oder fünf Minuten (McDougall, 2000; Kosch et al., 2001). Die schnelle Infusion von Ferrlecit[®] führt zu einer Transferrin-Übersättigung (Zanen et al., 1996) und „Bleomycin Detectable Iron“ (BDI, freies Eisen im Plasma; Parrkinen et al., 2000; Gupta, 2000). Eine Erhöhung des Gehaltes an oxidierten Proteinen im Blut und MDA im Plasma weist auf eine LPO-Induktion hin (Roob et al., 2000; Tovbin et al., 2002).

2.7 Nierentransplantation

Die Ersatztherapie Nierentransplantation (NT) bedeutet für den Patienten eine höhere Lebensqualität verglichen mit der zeitintensiven HD. Bis heute wurden in Deutschland über 60.000 Organe transplantiert, wobei die Nieren mit über 44.000 den größten Anteil ausmachen (Remuzzi et al., 2002). Bei der Nierentransplantation kommt es – wie bei der HD – zu einem starken oxidativen Stress, der durch die Ischämie-Reperfusion, durch immunologische Prozesse (nicht-körpereigenes Organ) und durch die Medikation verursacht sein dürfte. Er zeichnet sich z. B. durch erhöhte Konzentrationen an Plasma-MDA, CAT, SOD und Thymidylglykol im Urin aus. (Simic-Ogrizovic et al., 1998; Thier et al., 1999; Makropoulos et al., 2000; Taylor et al., 1993; Biernacki et al., 2002; Halliwell & Gutteridge, 1999; Perez Fernandez et al., 2002)

2.8 Molecular Adsorbent Recycling System (MARS)

Der Leber kommt im Körper als zentrales Stoffwechsel- und Syntheseorgan eine besonders wichtige Rolle zu. Ein starker Alkoholabusus oder virale Entzündungen führen zu einer verminderten Leistung bis hin zum Leberversagen (LV). Zur Behandlung des akuten LV wird ein System benötigt, das genügend Zeit für eine Regeneration des Organs oder für die Beschaffung einer Spenderleber verschafft. Einige Moleküle mit geringem Molekulargewicht scheinen beim LV eine besondere Rolle zu spielen, wie z. B. Bilirubin, Gallensäuren, aromatische Aminosäuren, Ammoniak und Laktat. Diese Stoffe werden für die Komplikationen wie Multiorganversagen und hepatische Enzephalopathie verantwortlich gemacht. Einige dieser endogenen Toxine sind wasserlöslich, die meisten liegen an Albumin gebunden vor. Da aber die Bindungsstellen im Albumin limitiert sind, wird Albumin bei verminderter Detoxifikationsleistung der Leber stark überladen, was zu freien, ungebundenen Toxinen führt. Weder die HD noch andere Nierenersatzverfahren sind in der Lage, die verantwortlichen Stoffe ausreichend zu eliminieren und damit das Leben solcher Patienten entscheidend zu verlängern. Neben den Versuchen mit biologischen Systemen wie primären Schweinehepatozyten und menschlichen Zelllinien gibt es einen technischen Ansatz, der von Stange et al. (1999) entwickelt wurde: das „Molecular Adsorbent Recycling System“ (MARS). MARS imitiert die Hepatozytenmembran, wobei es durch Transfer von proteingebundenen und wasserlöslichen Stoffwechselprodukten aus dem Blut in ein Dialysat über eine speziell modifizierte, semipermeable Membran kommt. Das Blut wird nicht direkt – wie bei der HD – gegen Wasser dialysiert, sondern gegen eine Albuminlösung, die durch einen Aktivkohlefilter, einen Anionentauscher und eine herkömmliche HD wieder regeneriert wird (s. Abbildung 2.19). Eine MARS-Behandlung dauert bis zu acht Stunden und wird je nach Gesundheitszustand des Patienten täglich oder alle zwei Tage durchgeführt.

Da dieses Verfahren erst gegen Ende der neunziger Jahre entwickelt wurde und zum Einsatz kam, sind bisher noch keine Daten zur Induktion von Bioinkompatibilitätsreaktionen und oxidativem Stress bekannt. Da aber das Prinzip dieser Behandlung auf dem der HD – mit einer modifizierten Membran – basiert, sind die gleichen pathologischen Vorgänge im Patienten denkbar.

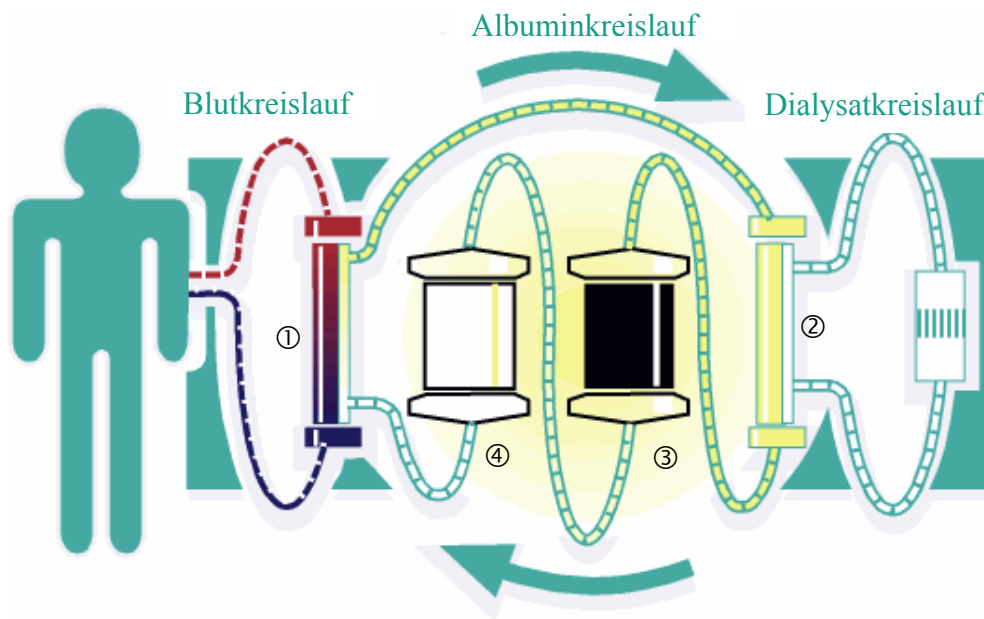


Abbildung 2.19: Prinzip der MARS-Therapie (nach www.leberdialyse.de): das Blut wird über eine spezielle MARS-Membran gegen eine Albuminlösung (①) dialysiert. Die Albuminlösung wird mit einer herkömmlichen Dialysemembran (②), mit einem Aktivkohlefilter (③) und einem Anionentauscher (④) wieder regeneriert.

2.9 Testmethoden

2.9.1 Harnsäure-Bestimmung

Das wasserlösliche Antioxidanz Harnsäure wurde photometrisch im Blutplasma bestimmt, das durch Zentrifugation gewonnen wurde. Hierbei wurde die Harnsäure mit dem Enzym Urikase zu Allantoin und H_2O_2 umgesetzt. H_2O_2 oxidierte mit Hilfe einer Peroxidase 4-Aminoantipyrin (4-AAP) und 3,5-Dichloro-2-hydroxyphenylsulfonat (DHBS) zu einem Chinoniminfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 520nm (s. Abbildung 2.20).

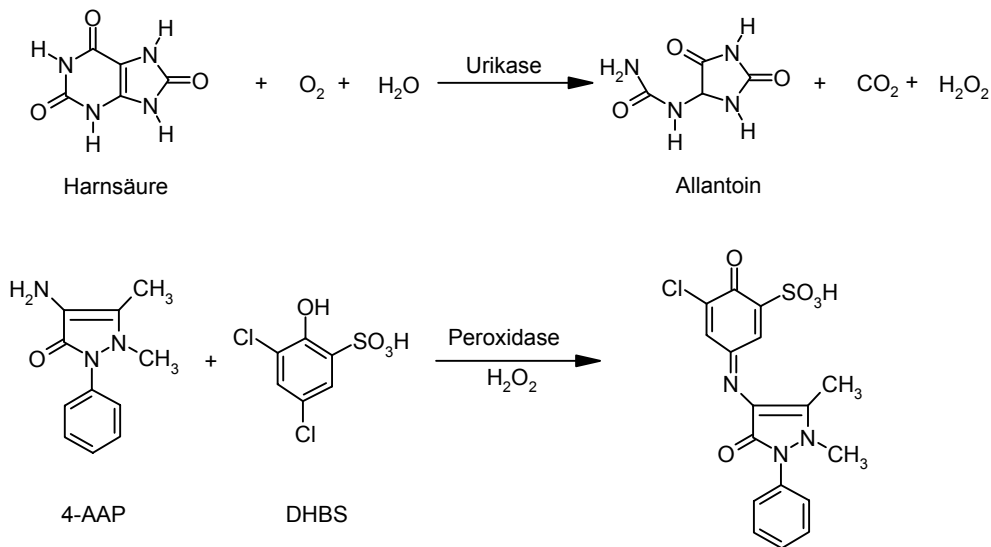


Abbildung 2.20: Prinzip der Harnsäure-Bestimmung; 4-AAP: 4-Amino-Antipyrin, DHBS: 3,5-Dichloro-2-hydroxyphenylsulfonat (nach Sigma Diagnostics)

2.9.2 Glutathion-Bestimmung

Das antioxidativ wirksame Glutathion wurde in Vollblutproben gemessen, wobei die GSH-reichen Blutzellen und das GSH-arme Plasma zusammengefasst wurden. Bei der hier angewendeten Glutathion-Bestimmung wurde ein weit verbreitetes und einfaches Verfahren gewählt, das sich an die Bestimmung von Akerboom und Sies (1981) anlehnte und von Gallagher et al. (1994) modifiziert wurde.

Es handelte sich um einen hochempfindlichen, kinetischen Assay, in dem GSH, GSSG und Glutathionreduktase (GSR) kontinuierlich 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) in einer NADPH-abhängigen Reaktion zum chromophoren 5-Thio-2-Nitrobenzoat (TNB) reduzieren. In Abbildung 2.21 ist das Schema der Reaktion dargestellt.

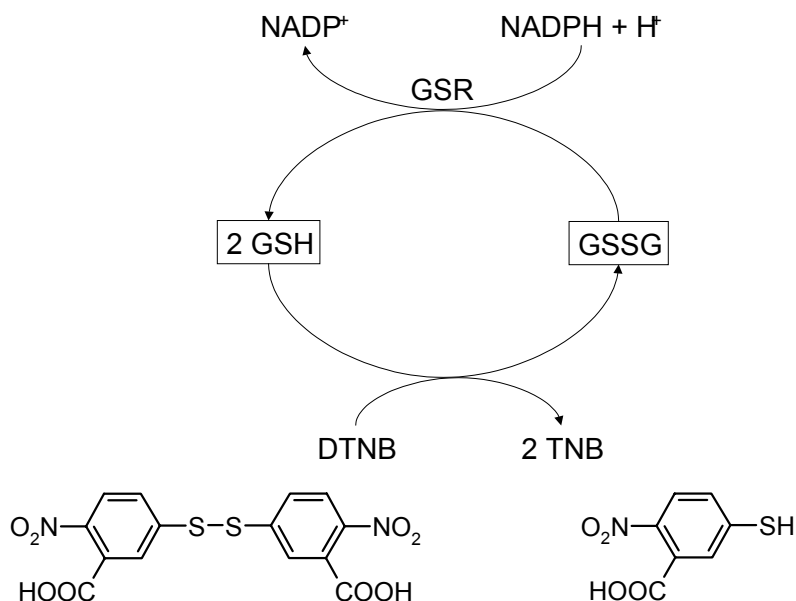


Abbildung 2.21: Reduktion von DTNB in einer NADPH-abhängigen Reaktion zum Chromophor TNB, in Anwesenheit von GSH und GSSG

Die Bildung von TNB wurde über die Extinktion bei 412 nm zeitlich verfolgt. Die Geschwindigkeit der TNB-Bildung, also die Extinktionszunahme in einer bestimmten Zeit, war proportional zur tGSH-Konzentration. Die Berechnung der tGSH-Konzentration erfolgte durch Vergleich mit entsprechenden Standardlösungen.

Zur Messung von GSSG wurde GSH mit einer nukleophilen Substanz (2-Vinylpyridin) abgefangen (s. Abbildung 2.22) und anschließend wieder die obige Messung durchgeführt. Durch Differenzbildung ließ sich der GSH-Anteil und der GSH-Status (Quotient GSH/tGSH) berechnen.

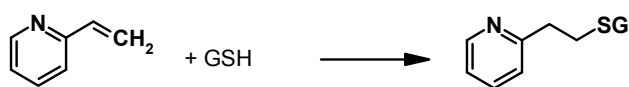


Abbildung 2.22: Derivatisierung von GSH durch Reaktion mit 2-Vinylpyridin

Bei dieser Bestimmung musste darauf geachtet werden, dass die Blutproben sofort nach der Entnahme (2-3 Minuten) zur Proteinfällung in 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA, 10%) gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren werden mussten, um z. B. eine Oxidation von GSH zu verhindern.

2.9.3 Malondialdehyd-Bestimmung

Der Lipidperoxidations- und Entzündungsmarker MDA kann direkt photometrisch bei 234nm oder nach Freisetzung aus den Lipidanteilen des Blutplasmas und Derivatisierung mit Thio-barbitursäure (TBA) photometrisch/fluorimetrisch bestimmt werden. Da mit TBA eine ganze Reihe von Aldehyden und Ketonen reagieren, konnte das MDA-Derivat nur durch chromatographische Trennung der TBARS und Fluoreszenz-Detektion spezifisch quantifiziert werden. (s. Abbildung 2.23, Janero, 1990; Esterbauer et al., 1991; Reetz, 2001).

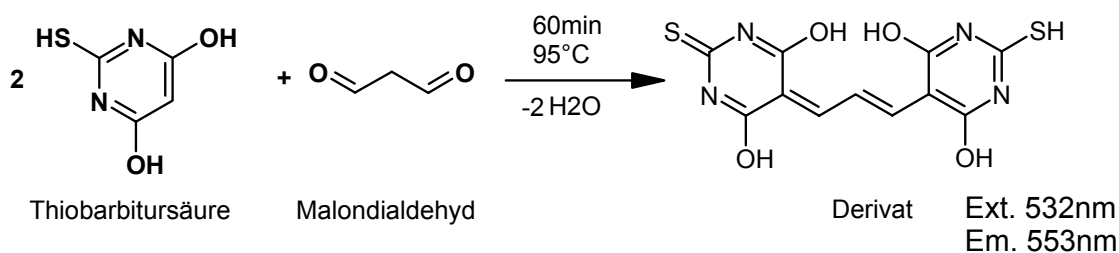


Abbildung 2.23: Derivatisierung von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure

2.9.4 M_{dG} -Bestimmung

Das Addukt M₁dG wurde bisher in Geweben wie Leber, Pankreas, Brust und in weißen Blutzellen über LC/MS, ³²P-Postlabelling oder immunchemisch nachgewiesen (Chaudhary et al., 1994; Fang et al., 1996; Leuratti et al., 1998; Singh et al., 2001; Marnett, 1999; Vaca et al., 1992). Bei Postlabelling- oder chromatographischen Untersuchungen wurden immer 10-50µg DNA eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde das prämutagene Reaktionsprodukt M₁dG aus MDA und der DNA-Base dG mit einer immunchemischen Methode erfasst, die weniger als 5µg DNA benötigte (s. Abbildung 2.24; Leuratti et al., 1998; Singh, 2002). Diese Methode besaß eine hohe Empfindlichkeit und ermöglichte einen hohen Probendurchsatz.

Die DNA wurde aus den weißen Blutzellen isoliert und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Nach Fixierung der DNA im Trockenschrank wurde mit einer Milchpulverlösung geblockt. Anschließend wurde mit dem Primärantikörper D10A1H9 gegen M₁dG inkubiert, der freundlicherweise von L. J. Marnett, Nashville, USA zur Verfügung gestellt wurde. Nach Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper gegen den Primärantikörper wurden in einer Chemolumineszenzreaktion (Luminol) M₁dG-Intensitäten bestimmt. Diese Intensitäten wurden auf die eingesetzte DNA-Menge, die nach Propidiumiodidfärbung bestimmt wurde, bezogen und mit Standards verglichen.

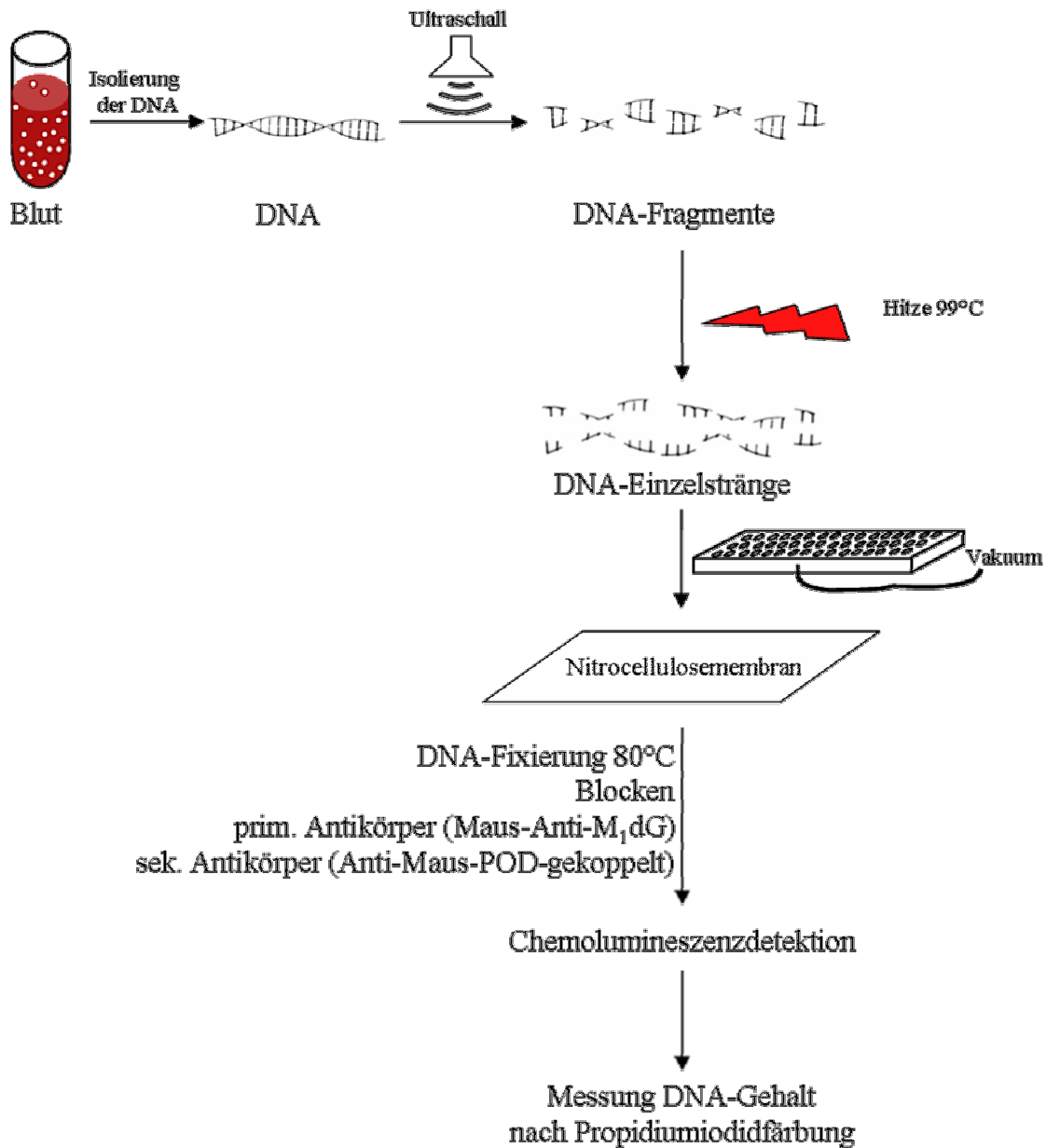


Abbildung 2.24: Prinzip des Immunoslotblot zur Bestimmung von M₁dG

2.9.5 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden

DNA-Schäden werden sehr häufig über Strangbrüche gemessen. Hier kommen unterschiedliche Methoden zum Einsatz: Der Einbau von [³H]-Thymidin oder Bromdesoxyuridin in die DNA ist ein Maß für reparatur- oder substanzinduzierte Strangbrüche. Bei der Methode der alkalischen DNA-Entwindung passieren stark fragmentierte DNA-Proben nach Alkali-Behandlung schneller einen Filter als intakte, hochmolekulare DNA-Proben, was durch Fluoreszenzderivatisierung der DNA ebenfalls erfassbar ist. Oxidativ modifizierte Purine oder

Pyrimidine werden nach DNA-Hydrolyse mittels GC/MS oder HPLC/ECD nachgewiesen. Der häufigste untersuchte Marker für oxidierte Basen ist 8-OH-dG.

Der „Comet Assay“ ist ebenfalls eine Methode zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen und zurückzuführen auf eine Beobachtung von Rydberg und Johanson (1978), dass nach Strahlenbehandlung von Zellen die Zellkerne mit zunehmender Strahlendosis immer diffuser wurden. Ostling und Johanson (1984) verbesserten diese Technik durch eine anschließende Elektrophorese, bei der die DNA unterschiedlich weit aus dem Zellkern heraustrat.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in ein Agarosegel eingebettet und lysiert. Anschließend wurde die DNA in einer Elektrophoresekammer im alkalischen Milieu entwunden, einer Elektrophorese unterzogen, neutralisiert und mit Ethidiumbromid gefärbt (s. Abbildung 2.26). An einem Fluoreszenzmikroskop wurden mit Hilfe einer Digitalkamera und einer Image Analysis Software die Zellkerne ausgewertet (s. Abbildung 2.25). Als Maß für die DNA-Strangbrüche wurden verschiedene Parameter angewandt. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität im Schweif oder „tail intensity“ (TI%) (Maß für den prozentualen Anteil an DNA im Kometen-Schweif) ist heute am weitesten verbreitet. Je höher TI% ist, desto mehr Strangbrüche waren vorhanden bzw. desto größer war der DNA-Schaden.

Wird der Schritt der DNA-Entwindung unter neutralen Bedingungen durchgeführt, werden nur DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) erfasst. Im alkalischen Milieu liegt die DNA in Einzelstränge denaturiert vor. Deshalb werden neben DSB auch Einzelstrangbrüche (SSB) und alkali-labile Stellen detektiert (Fairbairn et al., 1995): SSB werden ab einem $\text{pH} \geq 12,1$ detektiert, alkali-labile Stellen ab $\text{pH} \geq 13$, so dass die Variation des pH-Wertes zusätzliche Informationen zur Art der DNA-Schäden liefert (Horváthová et al., 1998). Der Comet Assay wird meist im alkalischen Milieu ($\text{pH} \geq 13$) durchgeführt (Singh et al., 1988; Kassie et al., 2000; Fairbairn et al., 1995).

Durch die Behandlung der Zellkerne mit dem Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) in den Agarosegelen werden zusätzlich Strangbrüche aus oxidativen DNA-Schädigungen erfasst. Dieses Reparaturprotein aus *E. coli* erkennt spezifisch oxidativ modifizierte Purinbasen und fügt an solchen Stellen zusätzliche Strangbrüche in die DNA ein, was zu einer Verstärkung der Schweifintensität führt (Prinzip s. Abbildung 2.26). Der Unterschied zwischen Strangbrüchen aus oxidativen DNA-Schädigungen (mit FPG-Enzymbehandlung) und direkten Strangbrüchen (ohne Enzymbehandlung) entspricht den spezifisch oxidativen DNA-Schäden oder auch „FPG sensitive sites“. (Collins et al., 1996)

Zur Vereinfachung wurden in dieser Arbeit die DNA-Strangbrüche nach FPG-Behandlung (Summe aus direkten und durch FPG zusätzlich eingeführte Strangbrüche) als „oxidative

DNA-Schäden“ bezeichnet, da die direkten DNA-Strangbrüche nur einen relativ geringen Anteil ausmachen. In den Abbildungen wurden diese oxidativen DNA-Schäden durch „+ FPG“ kenntlich gemacht (s. Kapitel 4).

Der Comet Assay wurde mit den DNA-haltigen Bestandteilen des Blutes, d. h. den Leukozyten durchgeführt. Leukozyten setzen sich zusammen aus 20-40% Lymphozyten, 1-6% Monozyten und 50-75% Granulozyten. Granulozyten und Monozyten haben Lebenszeiten von wenigen Tagen und sind für Phagozytose verantwortlich. Lymphozyten leben Monate bis Jahre und sind Träger der spezifischen humoralen und zellvermittelten Immunität. Die Zahl an Leukozyten beträgt etwa 8000/ μl Blut. (Niesink et al., 1996; Klinke et al., 1996; Delves et al., 2000)

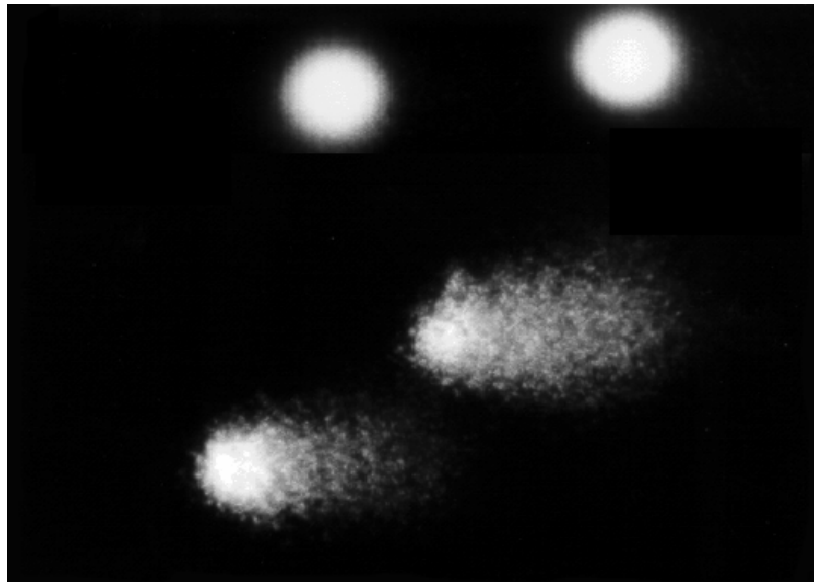


Abbildung 2.25: Bild von zwei ungeschädigten, einem mittel geschädigten und einem stark geschädigten Zellkern im Comet Assay nach Färbung mit Ethidiumbromid

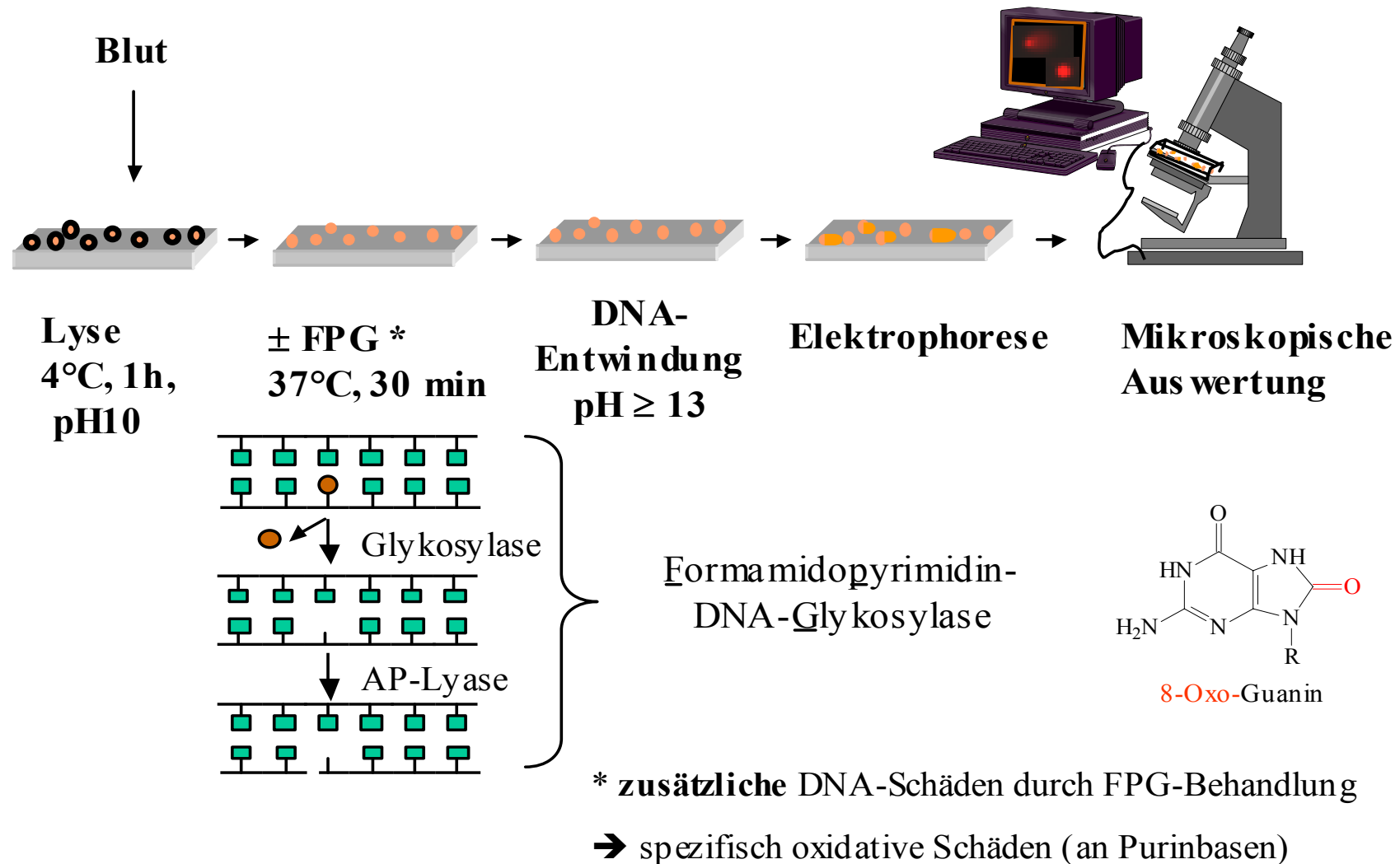


Abbildung 2.26: Prinzip der Durchführung des Comet Assay

3 Problemstellung

Viele Erkrankungen sind durch ROS verursacht oder werden von einer die antioxidative Abwehr überschießenden ROS-Produktion begleitet. Die Wirkung dieses oxidativen Stresses kann durch die Untersuchung von Veränderungen an Makromolekülen wie DNA, Lipiden oder Proteinen nachgewiesen werden.

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, die mit Nierenersatzverfahren behandelt werden, unterliegen ebenfalls einem starken oxidativen Stress. Bei der Hämodialyse (HD) werden für dieses Ungleichgewicht der Antioxidantienverlust während der HD, Fehl- oder Mangelernährung und die Akkumulation von AGEs verantwortlich gemacht. Die Behandlung mit bioinkompatiblen Dialysemembranen und die begleitend auftretende Anämie tragen weiter zu diesem oxidativen Stress bei (Canaud et al., 1999; Galli et al., 2000; Kaysen, 2001; Hasselwander et al., 1998; Kaysen, 2000; Boaz et al., 2001; Weiss, 1999; Vlassara et al., 2002; Raj et al., 2000; Nawroth et al., 1999; Miyata et al., 2000). Durch den Kontakt des Blutes mit der nicht biogenen Membranoberfläche werden Granulozyten und das Komplementsystem aktiviert, wodurch Entzündungsreaktionen imitiert werden, bei denen ROS entstehen (Sarre et al., 1988; Schifffl et al., 1999; Bowry, 2002). Bei Behandlung der renalen Anämie mit intravenösen Eisenpräparaten kann es zu einer Transferrinübersättigung kommen, das freie Eisen kann dann über die Fentonreaktion ROS generieren, die die Blutbestandteile schädigen (Parrkinen et al., 2000; Zanen et al., 1996). Die Konsequenz des oxidativen Stresses ist für HD-Patienten eine höhere Morbidität und Mortalität für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die schon 10 bis 20 Jahre früher auftreten als im Bevölkerungsdurchschnitt (Canaud et al., 1999). Das Risiko, an Nieren-, Blasen-, Schilddrüsen-Tumoren und Tumoren anderer endokriner Organen zu erkranken, ist ebenfalls erhöht (Maisonnette et al., 1999).

Ein von der HD abgeleitetes Verfahren zur Therapie von Patienten mit akutem Leberversagen ist das Molecular Adsorbent Recycling System (MARS). Hierbei wird das Blut über eine speziell modifizierte HD-Membran gegen eine Albuminlösung dialysiert, die dann mittels einer herkömmlichen HD wieder regeneriert wird (Stange et al., 1999). Diese Einheit aus spezieller Membran und Albuminlösung ermöglicht den Stofftransport der albumingebundenen Toxine aus dem Blut ins Dialysat, wodurch die Leber und der Körper des Patienten entlastet wird. Bioinkompatibilitätsreaktionen von Patienten auf diese spezielle Membran wurden bisher noch nicht beschrieben, da sich dieses Leberersatzverfahren erst seit Ende der Neunziger Jahre im Einsatz befindet.

Die Ersatztherapie Nierentransplantation ermöglicht Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz im Vergleich zur HD ein unabhängigeres Leben und verschafft so mehr Lebensqualität. Allerdings induziert auch die Transplantation eines Fremdorgans und die damit verbundene Behandlung mit Immunsuppressiva oxidativen Stress.

Das Ausmaß dieses oxidativen Stresses lässt sich durch medizintechnische und medikamentöse Verbesserungen reduzieren. Des Weiteren kann eventuell auch durch die Aufnahme von Antioxidantien aus Lebensmitteln wie Obst- und Gemüsesäften oder Nahrungsergänzungsmitteln das Risiko für ROS-bedingte Folgeerkrankungen verringert werden.

In dieser Arbeit sollte Blut von Patienten und Probanden mit verschiedenen Endpunkten für oxidativen Stress untersucht werden. Die Marker wurden so gewählt, dass ein möglichst breites Bild der oxidativen Schädigung von DNA und Lipiden, sowie der Kompartimente Blutplasma und Blutzellen entsteht. Oxidative DNA-Schäden in Leukozyten von HD-Patienten sind bisher kaum untersucht. Um **oxidativ modifizierte Purinbasen** nachzuweisen, wurde erstmals der Comet Assay im Blut dieser Patienten als hochempfindlicher und viel versprechender Marker angewandt.

Zur Bestimmung von **Glutathion**, das fast ausschließlich in den Erythrozyten und Leukozyten vorkommt, sollte die Methode von Gallagher et al. (1994) für den Einsatz in Vollblut optimiert werden. Veränderungen von GSH oder GSSG, die auf einen abweichenden oxidativen Status durch oxidative Belastung hinweisen, können so festgestellt werden. Die spezifische Erfassung des **LPO-Produkts MDA** im Plasma mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion sollte etabliert werden. Der bisher in dieser Patientengruppe noch nicht untersuchte Marker **MDA-DNA-Addukt M₁dG** sollte mit einer immunchemischen Methode nach Leuratti et al. (1998) quantifiziert werden können. Die antioxidativ wirksame **Harnsäure** sollte mit einem photometrischen Test im Plasma erfasst werden.

Durch Vergleich dieser Marker für oxidativen Stress in **gesunden Probanden und HD-Patienten** sollte die Eignung der unterschiedlichen Marker zur Bestimmung des erhöhten oxidativen Stress ermittelt bzw. bestätigt werden.

- Der **Einfluss der Dialysemembran** sollte untersucht werden. Einander gegenübergestellt wurden eine halbsynthetische, diacetylierte Cellulosemembran (Baxter DICEA 170; 1,7m² Oberfläche), eine halbsynthetische, Vitamin E-beschichtete Cellulosemembran (Terumo E15; 1,5m² Oberfläche) und eine synthetische Polysulfonmembran (Fresenius F8; 1,8m² Oberfläche). Die letzteren gelten als biokompatibler und induzie-

ren weniger oxidativen Stress (Bowry, 2002; Schiffel et al., 1999; MacGinley et al., 2001).

- Der **Einfluss einer Eisen-Infusion** mit einem Eisengluconat-Saccharose-Komplex sollte mit dem bereits beschriebenen Marker MDA (Roob et al., 2000) untersucht und mit der Bildung oxidativer DNA-Schäden verglichen werden.
- Die Induktion von (oxidativen) DNA-Schäden durch die speziell modifizierte Membran des **MARS-Verfahrens** (Molecular Adsorbent Recycling System) zur Therapie von Patienten mit akutem Leberversagen sollte der herkömmlicher HD-Membranen gegenüber gestellt werden. Außerdem sollte das Ausmaß der DNA-Schäden in diesem Patientenkollektiv sowohl mit dem von Patienten mit alkoholbedingter Hepatopathie als auch mit den gesunden Probanden verglichen werden.
- Die **Nierenersatztherapie Transplantation** führt nicht zu einer vollständigen Wiederherstellung antioxidativer Schutzmechanismen und damit auch nicht zu einer kompletten Verhinderung erhöhter oxidativer Zellschädigung. Die (oxidative) DNA-Schädigung in Leukozyten von Transplantations-Patienten sollte mit Hilfe des Comet Assays mit der von HD-Patienten und gesunden Probanden verglichen werden.
- Die **antioxidative Wirkung eines Mischfruchtsaftes**, hergestellt von Prof. H. Dietrich, FA Geisenheim, sollte in einer Pilotstudie mit gesunden Probanden untersucht werden. Die Intervention mit diesem Saft verspricht aufgrund des hohen antioxidativen Potentials eine Verringerung der MDA-Konzentration im Plasma (Netzel et al., 2002) und möglicherweise auch der oxidativen DNA-Schäden.

4 Ergebnisse und erste Diskussion

4.1 Methodische Arbeiten

4.1.1 Vorarbeiten zur Bestimmung des Glutathiongehaltes in Vollblut

Der Gehalt von tGSH und GSSG in den Proben wurde mit einem kinetischen, photometrischen Test bestimmt (s. Kapitel 2.9.2). Die Bildung des reduktiv entstehenden Chromophors war proportional zur enthaltenen Glutathionkonzentration (Gallagher et al., 1994). Zur Bestimmung des GSSG-Gehaltes wurde GSH abgefangen.

Das zu untersuchende Blut konnte aufgrund der Entnahme im Krankenhaus nicht sofort nach Entnahme vermessen werden. Daher wurden verschiedene Möglichkeiten zur Lagerung der Proben untersucht. Hierzu wurden Gehalte direkt vermessener Proben mit denen gelagerter verglichen. Die Proteine wurden mit 5-SSA gefällt.

Tabelle 4.1: Eignung der verschiedenen Varianten des Einfrierens und Lagerns von Vollblut zur späteren Bestimmung von Glutathion; -: nicht geeignet, +:geeignet

Abtrennen der gefällten Proteine	–	–	–	+	–
Einfrieren	-20°C	-70°C	N ₂ (l)	-70°C	N ₂ (l)
Lagern	-20°C	-70°C	-70°C	-70°C	N ₂ (l)
Eignung	–	–	–	–	+

Durch sofortiges Einfrieren und Lagern der Blutproben in flüssigen Stickstoff kam es zu keinen Veränderungen im Vergleich zu direkt nach Entnahme gemessenen Proben (s. Tabelle 4.1)

4.1.2 Etablierung der Malondialdehyd-Bestimmung

4.1.2.1 Variation der Derivatisierung

Der Nachweis von MDA als Thiobarbitursäurederivat wurde mit Hilfe verschiedener Derivatisierungen (①,②,③) versucht. Anschließend wurde der Butanolextrakt der Reaktionslösungen per HPLC/Fluoreszenz (RP-18-Säule) vermessen.

- ① Bei der Durchführung wurden zwei Teile Perchlorsäurelösung mit einem Teil Thiobarbitursäurelösung (0,2%) gemischt und davon 80µl zu 10µl Probe oder MDA-Standard gegeben. Der Standard wurde durch Säurehydrolyse von Tetraethoxypropan generiert. Nach 60 Minuten Reaktion bei 95°C wurden die Lösungen gekühlt, das MDA-TBA-Derivat mit Butanol extrahiert und in der HPLC vermessen (Volpi et al., 1998; Reetz, 2001).
- ② Hier wurde die Thiobarbitursäurekonzentration auf 0,67% erhöht (im Vergleich zu ①).
- ③ Der kommerziell erhältliche Kit der Firma Sobioda, Frankreich bestand aus den Komponenten Perchlorsäurelösung, Thiobarbitursäurelösung und Tetraethoxypropan. Die Durchführung war analog Methode ① (Reetz, 2001).

In Tabelle 4.2 wurden Peakflächen von MDA-Standards dargestellt, die nach den drei Variationen derivatisiert wurden. Die gemessenen Peakflächen und damit die Steigung der Ausgleichsgerade waren mit den Lösungen aus dem Kit der Firma Sobioda am höchsten, was eine genauere und empfindlichere Messung ermöglichte. Diese Variation war deshalb den anderen vorzuziehen.

Tabelle 4.2: Beispiel für Peakflächen [$\mu V \times s$] in Abhängigkeit von MDA-Konzentration [μM] und Methodenvariation und die dazugehörige Ausgleichsgerade mit Korrelationskoeffizienten

Standard [μM]	Variation ①	Variation ②	Variation ③
0	39.019	19.944	135.602
0,625	40.574	42.860	245.348
1,25	58.340	69.070	324.388
2,5	86.081	116.506	492.564
5	164.920	233.041	924.154
Ausgleichsgerade	$y = 28726 + 26165x$	$y = 16252 + 42683x$	$y = 132552 + 155657x$
Korrelationskoeffizient	0,989	0,998	0,998

4.1.2.2 Variation des Fließmittels

Das Fließmittel für die HPLC setzte sich zusammen aus 63% Natrium-Phosphat-Puffer (12,5mM, pH 7,4) und 37% Methanol bei einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,7ml/min (Reetz, 2001). Nur bei der Messung von Plasmaproben waren zwei Peaks zu sehen (s. Abbildung 4.1), von denen der erste eindeutig aufgrund der Retentionszeit als TBA-MDA-Derivat zu identifizieren war. Der zweite Peak musste aus einer Substanz im Plasma entste-

hen, die ebenfalls in der Lage war, mit TBA fluoreszierende Verbindungen zu bilden. Das TBA-Derivat dieser Substanz eluierte allerdings später, könnte somit lipophiler als MDA sein oder eine höhere Molekülmasse besitzen. Trotz zahlreicher Untersuchungen u. a. auch von Reetz (2001), konnte das Molekül nicht identifiziert werden.

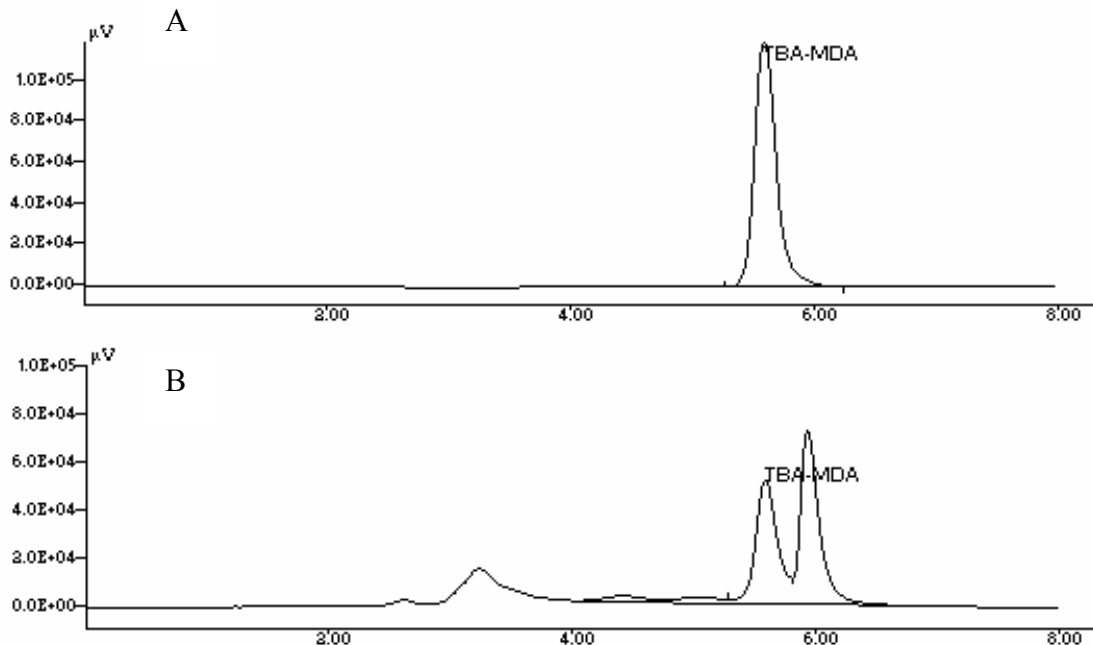


Abbildung 4.1: Chromatogramm des Butanolextraktes eines MDA-Standards (A) und einer mit TBA derivatisierten Plasmaprobe (B) mit 63% Natrium-Phosphat-Puffer (12,5mM, pH 7,4) und 37% Methanol bei einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,7ml/min

Da die beiden Peaks unter dieser Fließmittelbedingung nicht getrennt werden konnten, wurde das Puffer/Methanol-Verhältnis variiert. In Abbildung 4.2 wurden Chromatogramme unterschiedlichen Methanolanteilen im Fließmittel (33% bis 47%) dargestellt: Bei einer Verringerung des lipophilen Fließmittelanteils Methanol eluierten die beiden Signale später. Es war nur ein Peak zu erkennen, was auf eine Überlagerung von MDA- und unbekanntem Peak hinwies. Die Zusammensetzungen waren somit für die Bestimmung unbrauchbar. Erhöhte man hingegen den Methanolanteil, verkürzten sich die Retentionszeiten und der zweite Peak wurde deutlich von der Probe getrennt. Eine Fließmittelzusammensetzung von 43% Methanol und 57% Natrium-Phosphat-Puffer erwies sich als optimal bei einer Retentionszeit für das TBA-MDA-Derivat von 4,4min.

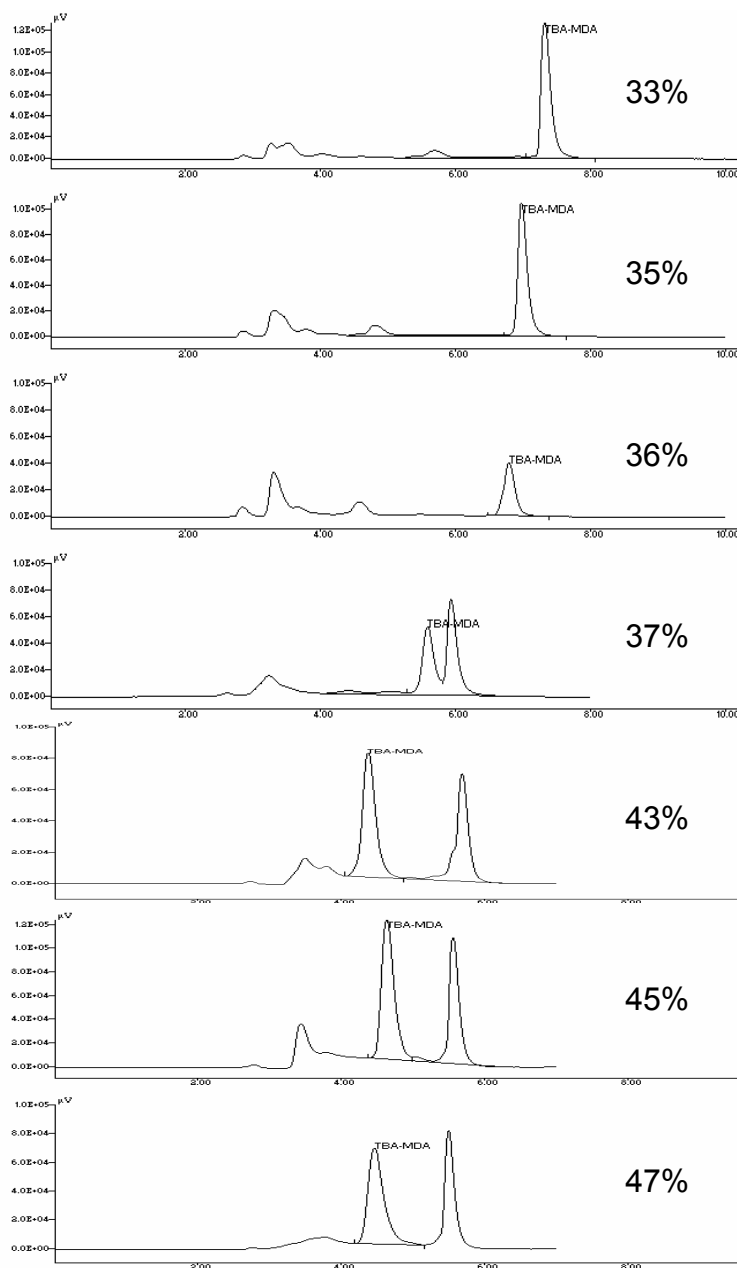


Abbildung 4.2: Chromatogramme der Butanolextrakte von mit TBA derivatisierten Plasmaproben bei unterschiedlichen Methanolanteilen und einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,7ml/min.

Um die Retentionszeit und die Lauflänge weiter zu verkürzen, wurde die Fließmittelgeschwindigkeit auf 1ml/min erhöht. Nun ergab sich eine Elutionszeit von 3,2min bei einer Verkürzung der Laufzeit von 7min auf 5min und einer guten Abtrennung des unbekannten Peaks (s. Abbildung 4.3).

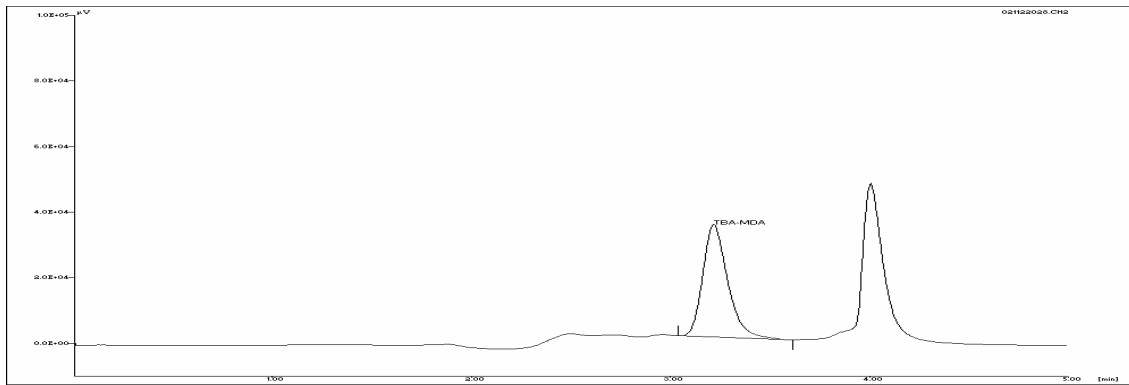


Abbildung 4.3: Chromatogramm des Butanolextraktes einer mit TBA derivatisierten Plasmaprobe mit 57% Natrium-Phosphat-Puffer (12,5mM, pH 7,4) und 43% Methanol bei einer Fließmittelgeschwindigkeit von 1ml/min

Die folgenden Bestimmungen des MDA-Gehaltes in Plasmaproben wurden mit den Reagenzien des kommerziell erhältlichen Kits von Sobioda und den optimierten chromatographischen Bedingungen durchgeführt. Es zeigte sich ebenfalls, dass unterschiedliche Derivatisierungsmethoden bei ungeeigneter chromatographischer Trennung bzw. direkter Messung des Butanolextrakts in einem Fluorimeter (Anweisung nach Kit) starke Variationen der Ergebnisse von MDA-Messungen verursachen könnten.

4.1.3 Etablierung der M_1dG -Bestimmung

4.1.3.1 Herstellung und Quantifizierung der M_1dG -Standard-DNA per HPLC

Zur Herstellung einer M_1dG -Standard-DNA nach Leuratti et al. (1998) wurde „Calf Thymus DNA“ (CT-DNA) mit 20mM MDA vier Tage bei 37°C behandelt. MDA wurde durch salzsaure Hydrolyse aus Tetraethoxypropan hergestellt. Nach Fällung und Aufreinigung der DNA wurde ein Aliquot mit Micrococcal Nuclease, Calf Spleen Phosphodiesterase und Nuclease P1 enzymatisch zu Desoxynukleosiden abgebaut. Der Gehalt der Nukleoside dA, dG, dC, dT und des Adduktes M_1dG wurde per HPLC/UV/Fluoreszenz bestimmt. Der M_1dG -Standard für die HPLC wurde freundlicherweise von L. Marnett (Nashville, Tennessee, USA) zur Verfügung gestellt.

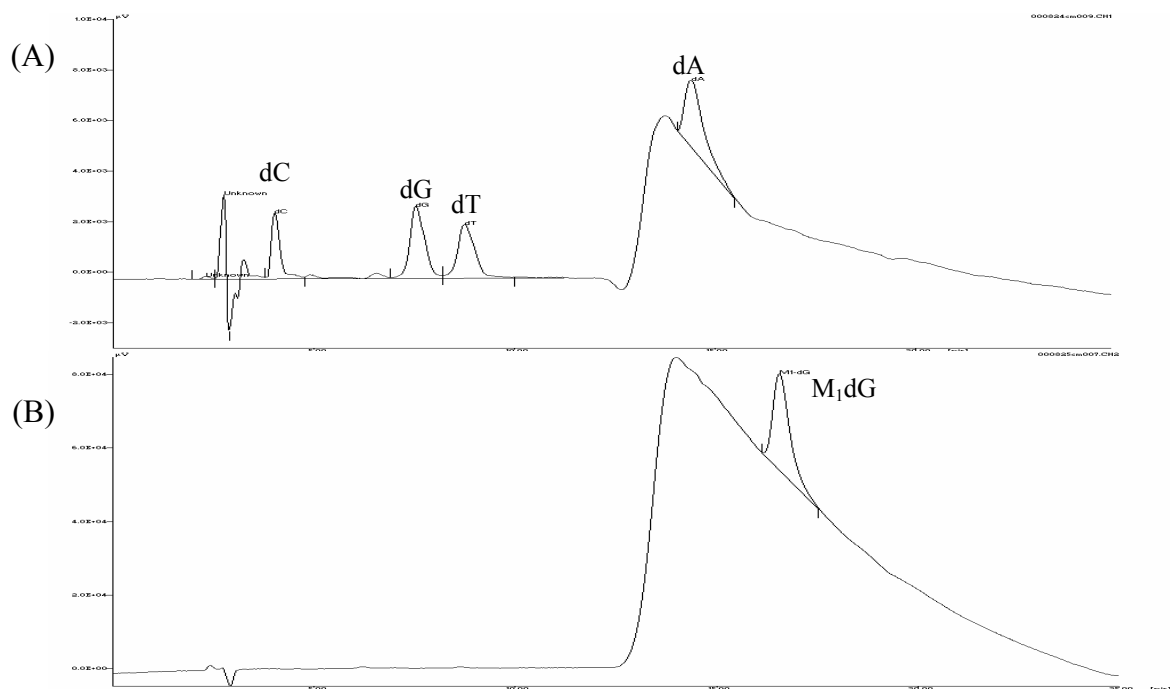
Die chromatographische Trennung der Nukleoside wurde im Vergleich zu Leuratti et al., (1998) variiert: Anstatt einer Hypersil BDS wurde eine LiChroSpher RP-18 Säule verwendet, so dass das Fließmittel wie folgt angepasst wurde (s. Tabelle 4.3):

Tabelle 4.3: Fließmittelgradient (0,7ml/min) zur Bestimmung von M₁dG

0-8min	90% Triethylammonium Acetat pH5 10% Ethanol
8-9min	80% Triethylammonium Acetat pH5 20% Ethanol
9-20min	90% Triethylammonium Acetat pH5 10% Ethanol

Die Nukleoside wurden bei 260nm detektiert, das stark fluoreszierende M₁dG bei einer Anregungswellenlänge von 360nm und einer Emissionswellenlänge von 490nm nachgewiesen (Müller, 2000).

In Abbildung 4.4 (A) ist die UV-Detektion des Nukleosid-Standards, im Teil (B) die Fluoreszenzdetektion des M₁dG-Standards dargestellt. Der Verlauf der Basislinie zwischen 12 und 15 Minuten lag im schnellen Fließmittelwechsel von TEA/Ethanol 90/10 auf 80/20 begründet, weshalb dieses Signal bei jedem Standard und jeder Probe zu beobachten war. Die Nukleoside eluierten wie erwartet in der Reihenfolge: dC, dG, dT und dA (Leuratti et al., 1998).

**Abbildung 4.4: Chromatographische Trennung eines Nukleosid-Standards (UV-Detektion, A) und eines M₁dG-Standards (Fluoreszenz-Detektion, B)**

Nach mehrfacher Bestimmung wurde ein M₁dG-Gehalt von 5,9pmol/μg DNA errechnet. Dies stimmte in etwa mit den Derivatisierungen von Leuratti et al. (1998) mit 6,75pmol/μg DNA und Singh et al. (2001) mit 12,69pmol/μg DNA überein.

4.1.3.2 Etablierung des Immunoslotblots

3,5 µg der selbsthergestellten MDA-modifizierten Standard-DNA wurden in den Konzentrationen 0; 0,4; 1; 2; 3; 5; 6; 8; 10 fmol M₁dG/µg DNA zum Immunoslotblot eingesetzt. Die Standards oder Proben wurden zunächst durch Ultraschall in Fragmente mit einer Länge von etwa 100 Basenpaaren gespalten. Anschließend wurde die DNA bei 99°C in Einzelstränge aufgetrennt und eine Menge von je 1 µg Standard- oder Proben-DNA per Vakuum aus drei „Slots“ auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (s. Kapitel 2.9.4 und Abbildung 4.5). Die DNA wurde im Trockenschrank bei 80°C auf der Membran fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer Milchpulverlösung geblockt. Nachdem zwei Stunden mit einem für M₁dG spezifischen, primären Antikörper inkubiert wurde (freundlicherweise von L. Marnett, Nashville, Tennessee, USA zur Verfügung gestellt) inkubierte man zwei Stunden mit einem Sekundärantikörper, der mit einer Peroxidase gekoppelt war.

Die Chemolumineszenzreaktion, die nach Zugabe eines Reagenzes am Enzym abläuft und die in einem Lumi-Imager[®] gemessen wurde, war ein Maß für den M₁dG-Gehalt der Proben. Danach wurde die DNA auf der Membran zur Messung der genau eingesetzten DNA-Menge mit Propidiumiodid gefärbt.

In Abbildung 4.5 wurde ein Blot von 9 M₁dG-Standards in drei Reihen gezeigt. Die Detektion der Chemolumineszenz (Teil A) zeigte eine lineare Abhängigkeit der Intensität vom M₁dG-Gehalt des Standards. Die DNA-Färbung mit Propidiumiodid wies bei allen aufgetragenen Proben und Standards eine für das Auge nicht zu unterscheidende Fluoreszenzintensität nach (Teil B).

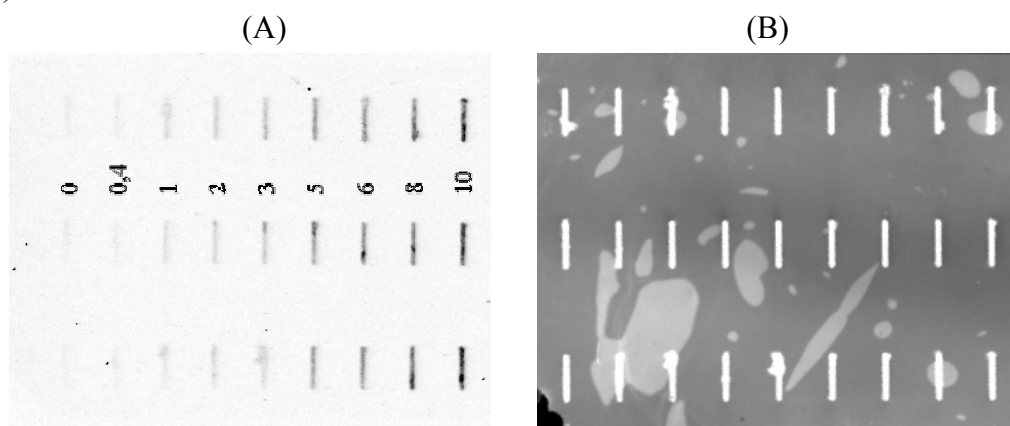


Abbildung 4.5: Beispiel für Immunoslotblot: geblottete M₁dG-Standards (Konzentrationen in fmol M₁dG/µg DNA); (A): Chemolumineszenzdetektion (15min Exposition) in Abhängigkeit vom M₁dG-Gehalt; (B): Detektion der DNA nach Propidiumiodid-Färbung

Danach wurden isolierte DNA-Proben aus Patienten- oder Probandenblut untersucht. In zahlreichen Versuchen ergaben sich nicht zufrieden stellende Ergebnisse (s. Abbildung 4.6). Es wurden 9 Standards und 9 Proben aufgetragen. Trotz einer extrem langen Detektion von 19 Minuten (gerätebedingtes Maximum) waren sowohl der kleinste Standard als auch die Proben kaum zu erkennen. Des Weiteren fehlte der fünfte Standard (Teil A). Die Propidiumiodid-Färbung (Teil B) wies jedoch auf etwa gleiche DNA-Mengen in jedem Slot hin. Da die Standards so gewählt waren, dass die humanen Proben in dem von ihnen begrenzten Bereich liegen sollten, musste von einer unempfindlichen Detektion ausgegangen werden. Dies konnte durch ein ungeeignetes Chemolumineszenzreagens, durch ein unempfindliches Messgerät oder durch prinzipielle, methodische Fehler bei der Durchführung verursacht worden sein. Während eines Aufenthalts bei R. Singh (Leicester, UK) wurden methodische Unterschiede ausgeräumt. Dennoch ergaben sich keine zufrieden stellenden Ergebnisse.

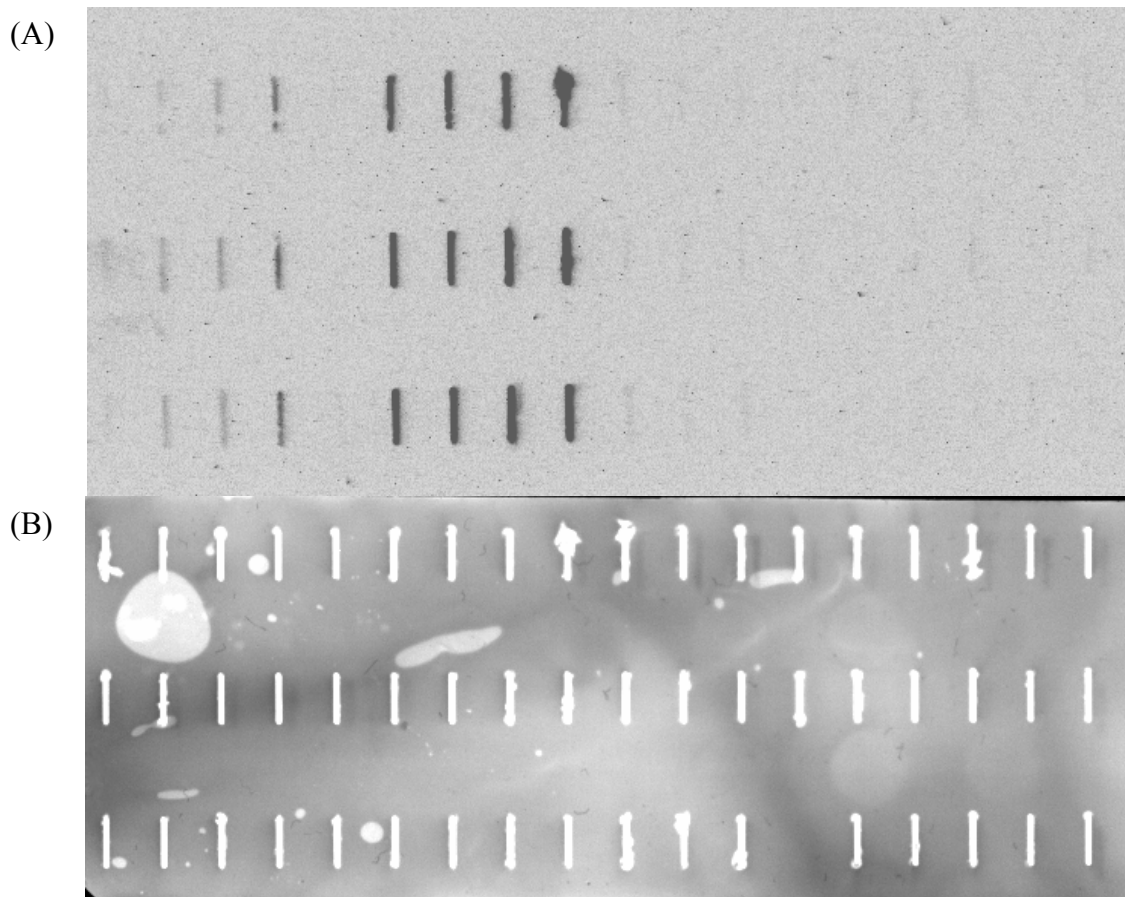


Abbildung 4.6: Beispiel für Immunoslotblot: 9 M₁dG-Standards, 9 Proben; (A): Chemolumineszenzdetektion (19min Exposition); (B): Detektion der DNA nach Propidiumiodid-Färbung

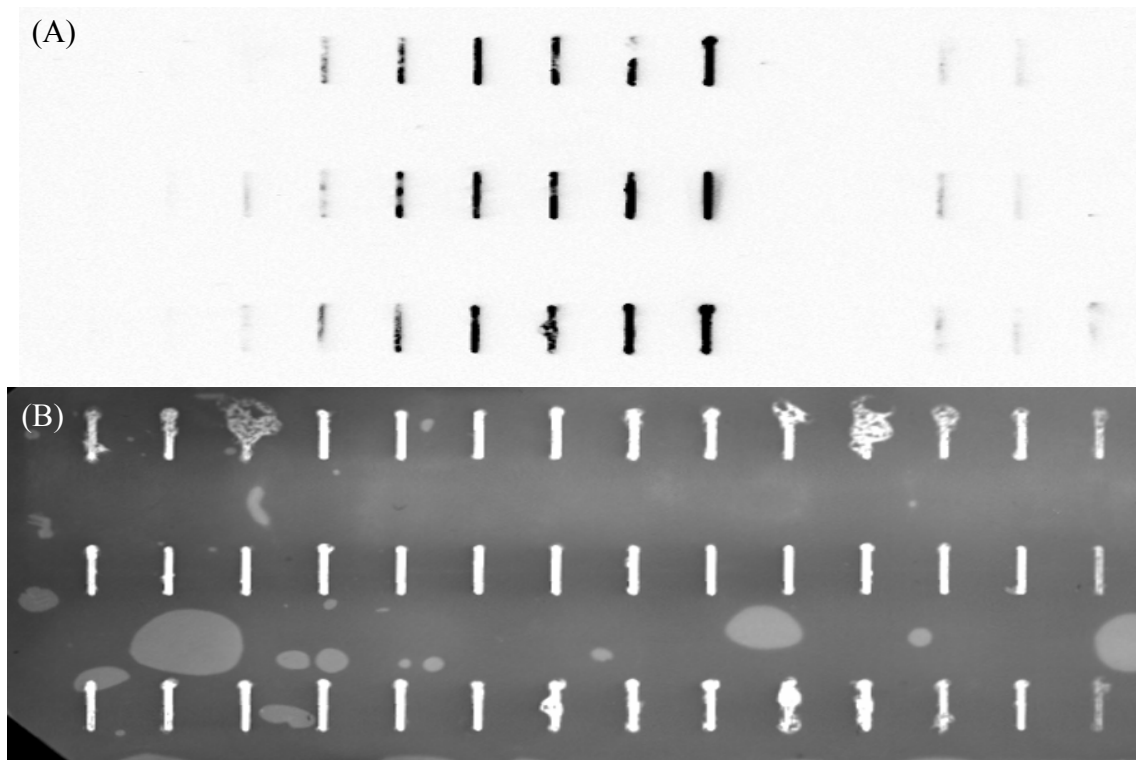


Abbildung 4.7: Beispiel für Immunoblot mit dem Reagenz von Pierce: 9 M₁dG-Standards, 5 Proben; (A): Chemolumineszenzdetektion (1min Exposition), (B): Detektion der DNA nach Propidiumiodid-Färbung

Um nun die Nachweisgrenze zu verbessern, wurde das Chemolumineszenzreagenz LumiGLO von Cell Signalling Technology gegen SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate von Pierce ausgetauscht. Damit wurden dieselben Lumineszenzintensitäten schon bei drastisch kürzeren Expositionszeiten beobachtet (1min Exposition; s. Abbildung 4.7 A). Die hier noch nicht sichtbaren Standards wurden bei einer längeren Exposition quantifizierbar.

Die so variierte Methode konnte anschließend zur Messung von Proben verwendet werden. Um maximale Intensitäten bei Proben und Standards und eine möglichst steile Kalibriergerade zu erhalten, wurde 19 Minuten detektiert (Beispiel s. Abbildung 4.8).

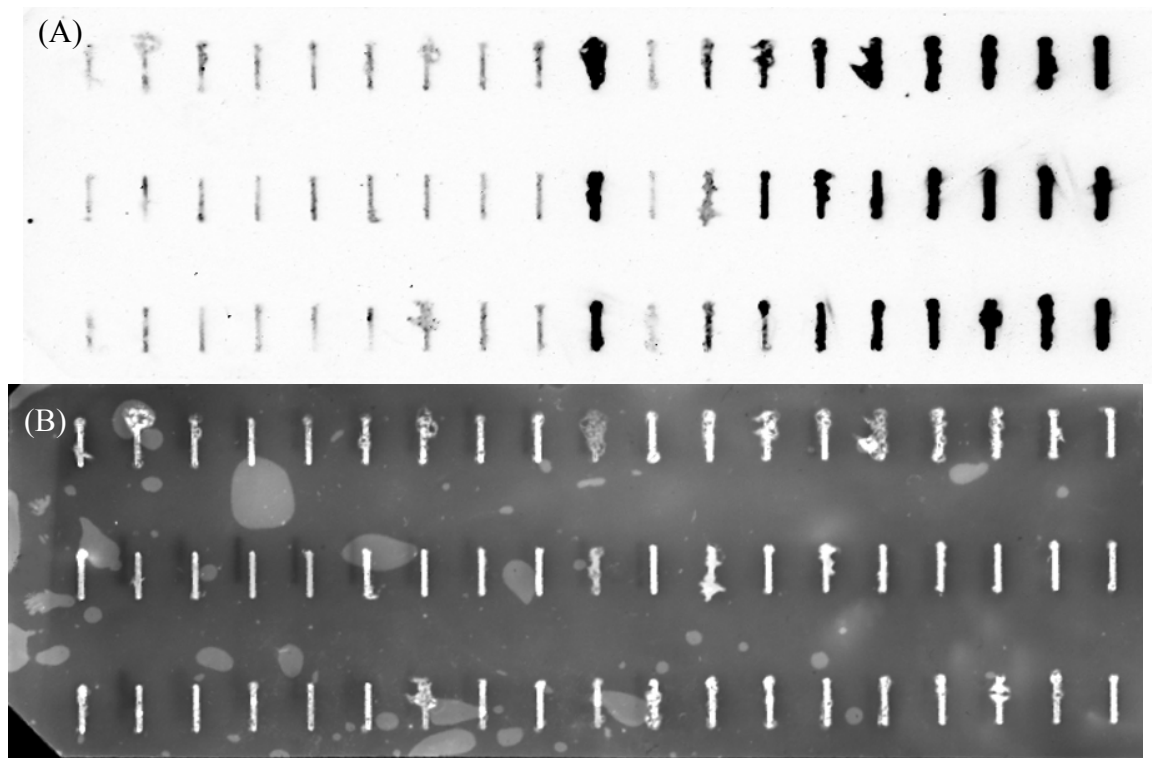


Abbildung 4.8: Beispiel für Immunoslotblot: 10 Proben, 9 korrigierte M₁dG-Standards; (A): Chemolumineszenzdetektion (19min Exposition), (B): Detektion der DNA nach Propidiumiodid-Färbung

Die Methoden zur Bestimmung der oxidativen DNA-Schäden waren bereits etabliert (Müller, 2000), die Harnsäure-Bestimmung wurde exakt nach publizierten Verfahren (Sigma Diagnostics) durchgeführt.

4.2 Untersuchung von HD-Patienten und Probanden

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchungen an HD-Patienten und Probanden vorgestellt.

Bei den Abbildungen der Ergebnisse im Verlauf der HD, der Membran-Studie und des Einflusses der Anämiebehandlung entsprechen die verschiedenen Symbole verschiedenen Patienten.

Berechnungen auf statistisch signifikante Unterschiede wurden durchgeführt mit dem Wilcoxon-(Rangsummen)-Test bei gepaarten bzw. abhängigen Ergebnissen, bei denen die Meßergebnisse von Variante A direkt mit der von Variante B verglichen wurde. Aus der Häufigkeit des Ereignisses $\text{Messwert A} > \text{Messwert B}$ wurde das Signifikanzniveau errechnet. Bei unabhängigen Ergebnissen wurde der Mann-Whitney U-Test angewandt, der auch auf dem Prinzip des Vergleichs von Messwerten basiert.

4.2.1 Vergleich von Patienten vor HD und Probanden

Die untersuchten Patienten waren zwischen 41 und 87 Jahre alt. Für die Niereninsuffizienz waren folgende Erkrankungen verantwortlich: Glomerulonephritis, polyzystische Nierengeneration, Amyloidose, interstitielle Nephritis, diabetische Nephropathie, Zystenniere und Schrumpfnieren. Die gesunden Probanden waren zwischen 25 und 62 Jahre alt.

4.2.1.1 Harnsäure-Bestimmung

In Abbildung 4.9 ist die Harnsäurekonzentration im Blutplasma von gesunden Probanden und von HD-Patienten dargestellt. Die Probanden ($150\text{--}350\mu\text{M}$; $n=6$) zeigten etwas niedrigere Harnsäurewerte als die Patienten vor HD ($170\text{--}500\mu\text{M}$; $n=10$).

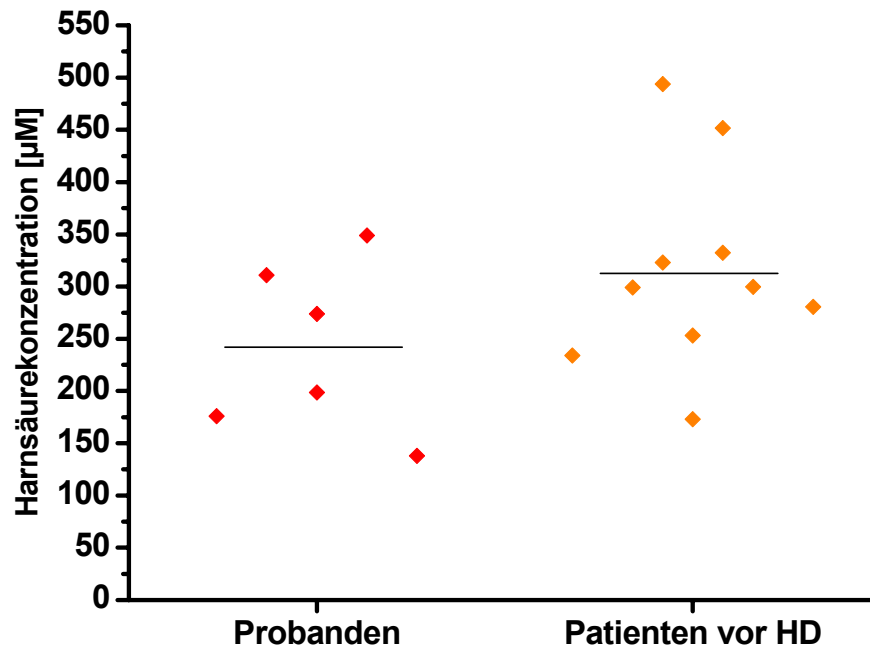


Abbildung 4.9: Harnsäurekonzentration [μM] im Plasma von gesunden Probanden ($n=6$) und Patienten vor HD ($n=10$)

4.2.1.2 Glutathion-Bestimmung

Die Konzentrationen an oxidiertem Glutathion (GSSG) und gesamten Glutathion (tGSH) im Blut von Probanden und Patienten vor HD wurden in Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11 aufgetragen. Es fand sich eine signifikante Erhöhung an GSSG bei den Patienten (Abbildung 4.10, Mittelwerte 53 μ M zu 36 μ M), wohingegen tGSH geringfügig tiefer lag (Abbildung 4.11, Mittelwerte 1040 μ M zu 1170 μ M). Aus den Werten wurde ein GSH-Anteil an tGSH von 93% für die Probanden und 89% für die Patienten errechnet.

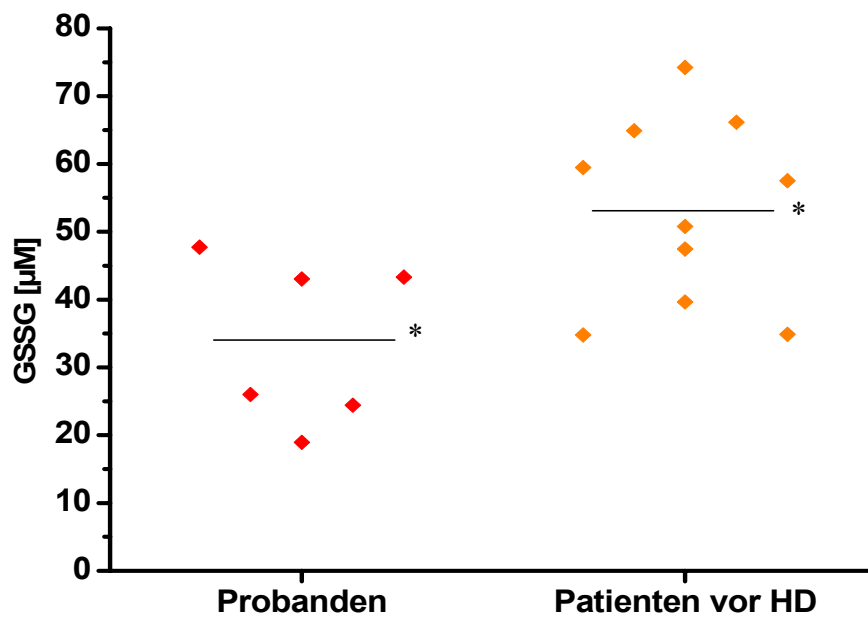


Abbildung 4.10: Konzentrationen [μ M] von GSSG im Vollblut von Probanden (n=6) und Patienten vor HD (n=10); Signifikanz *: p<0,05, Mann-Whitney U-Test

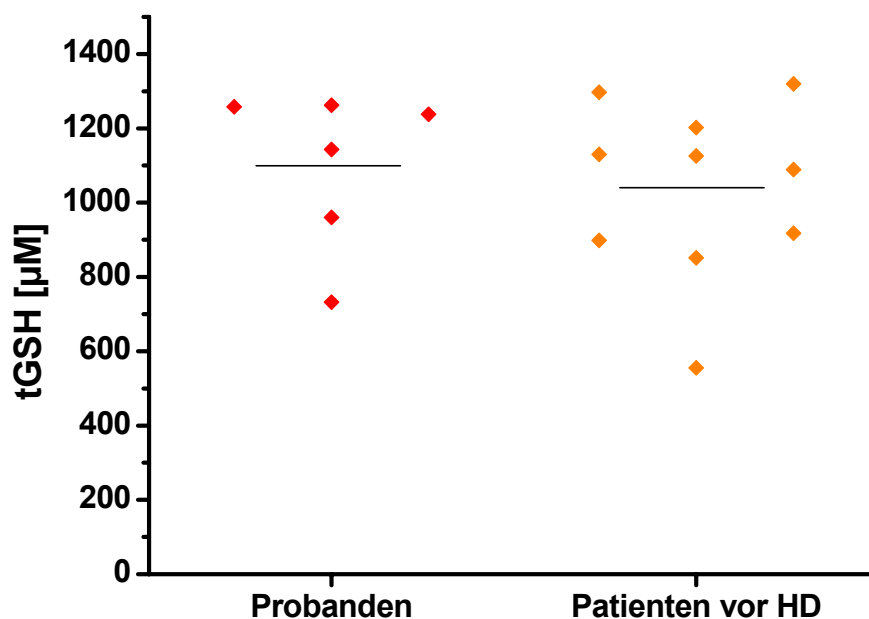


Abbildung 4.11: Konzentrationen [μ M] von tGSH im Vollblut von Probanden (n=6) und Patienten vor HD (n=10)

4.2.1.3 Malondialdehyd-Bestimmung

Der Gehalt von MDA im Plasma wurde von Probanden und Patienten vor HD bestimmt (s. Abbildung 4.12). Die Werte waren im Mittel nahezu identisch (Probanden: 1,1-2,5 μ M; Mittelwert: 1,65 μ M, Patienten: 0,8-2,3 μ M; Mittelwert: 1,56 μ M).

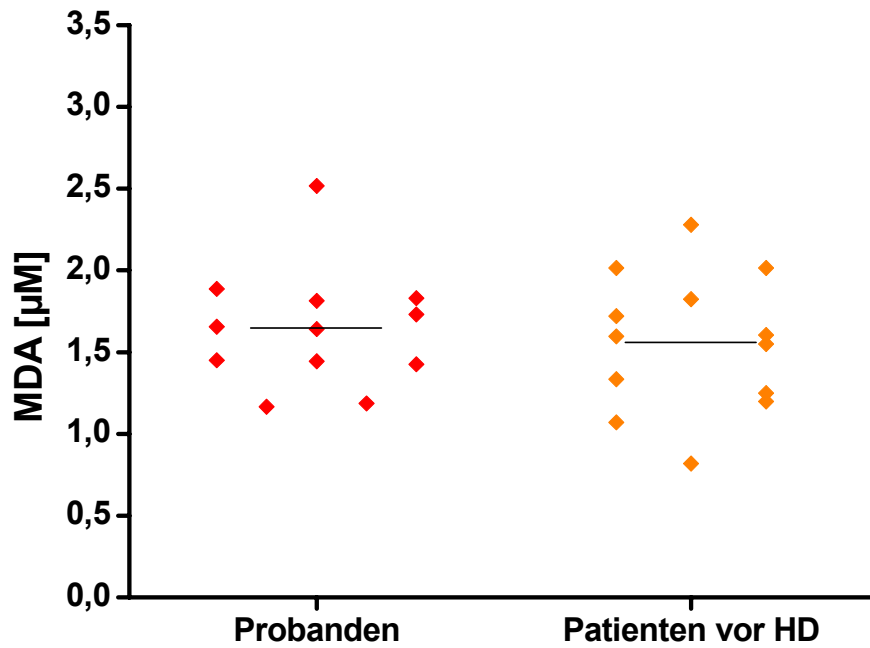


Abbildung 4.12: Konzentrationen von MDA [μ M] in Plasma von Probanden (n=12) und Patienten vor HD (n=13)

4.2.1.4 M₁dG-Bestimmung

Das prämutagene DNA-Addukt M₁dG wurde in Leukozyten von Probanden und Patienten vor HD untersucht. Das Ergebnis zeigte leicht erhöhte M₁dG-Gehalte bei den Patienten (s. Abbildung 4.13).

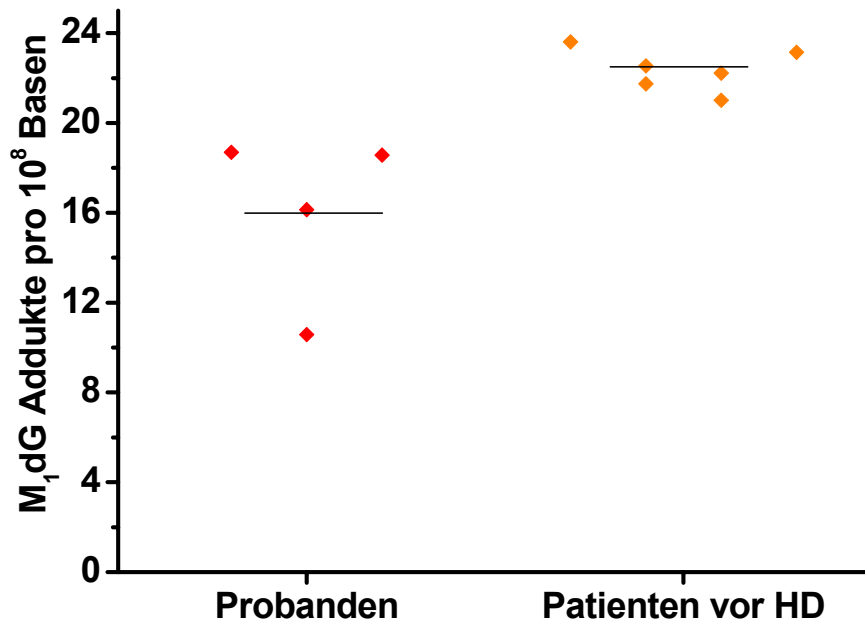


Abbildung 4.13: M₁dG-Gehalte in DNA aus Leukozyten von Probanden (n=4) und Patienten vor HD (n=6)

4.2.1.5 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

In Abbildung 4.14 ist das Ausmaß der (oxidativen) DNA-Schäden in Blut von Probanden und Patienten vor HD dargestellt. Bei den Probanden zeigten sich direkte DNA-Schäden um 0,4TI% und oxidative DNA-Schäden um 0,7TI%. Es ergab sich ein signifikanter oxidativer DNA-Schaden. Die direkten DNA-Schäden in den Patienten (0,6TI%) waren im Vergleich zu denen der Probanden erhöht. Das Ausmaß an oxidativen DNA-Schäden bei den Patienten war stark erhöht. Hier ergaben sich im Vergleich sowohl zu den oxidativen DNA-Schäden in Probanden als auch zu den direkten Schäden der Patienten hochsignifikante Unterschiede, die auf eine starke oxidative DNA-Schädigung hindeuteten. Des Weiteren zeigte sich hier eine große interindividuelle Variation (2-11TI%).

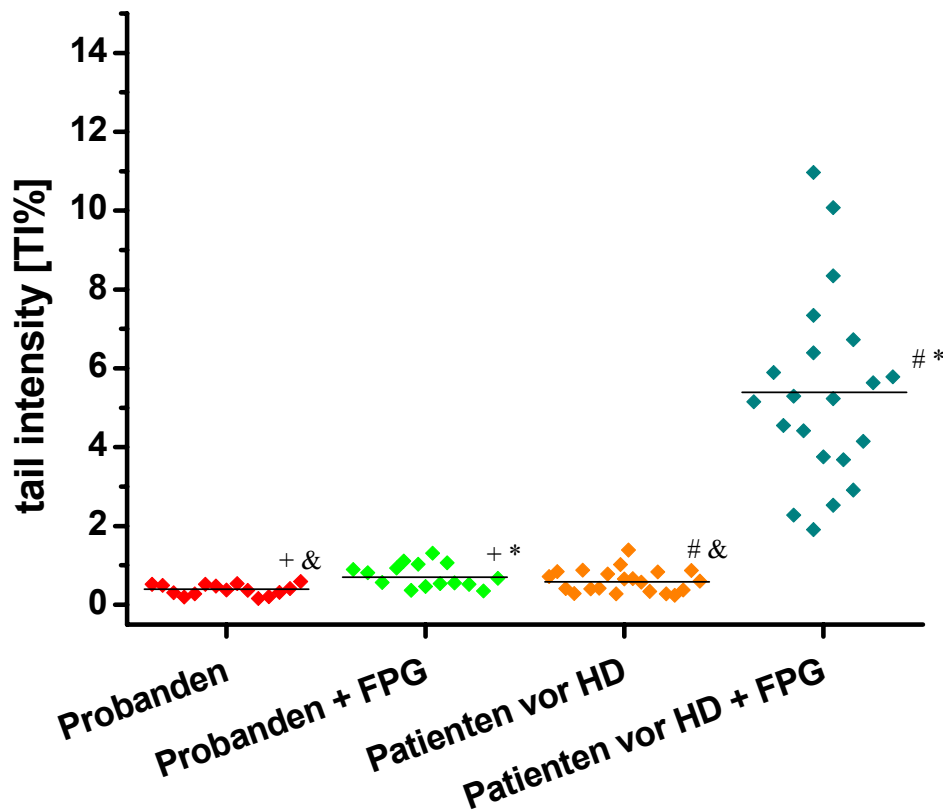


Abbildung 4.14: (Oxidative) DNA-Schäden in Leukozyten von Probanden (n=15) und Patienten vor HD (n=21); Signifikanz: +: $p < 0,01$; #: $p < 10^{-4}$ (Wilcoxon-Test); *: $p < 10^{-6}$; &: $p < 0,02$ (Mann-Whitney U-Test)

4.2.1.6 Diskussion

Die Harnsäurekonzentrationen im Plasma von Patienten vor HD waren höher als die von Probanden, die genau im Bereich der klinischen Normalwerte (119-357 μM) lagen. Im Gegensatz dazu befanden sich die Werte der Patienten eher an der oberen Grenze (Fresenius Kabi, 1999;

Sigma Diagnostics; Diem et al., 1975). Dies war auf den Zeitraum zwischen den Dialysen von zwei bis drei Tagen zurückzuführen, da in diesem Zeitraum nicht ausgeschieden werden konnte und sich die Harnsäure im Plasma anreicherte. Außerdem mussten einige HD-Patienten aufgrund ihres Diabetes eine Ernährung mit einem hohen Stärkeanteil reduzieren und einen Teil ihres Energiebedarfs mit proteinreichen Lebensmitteln bestreiten. Aus diesen konnte weitere Harnsäure gebildet werden. Jackson et al. (1995) führten die erhöhte antioxidative Kapazität im Plasma auf die erhöhten Harnsäurewerte zurück. Dies bestätigte Rice-Evans (2000) durch Untersuchung des Anteils der antioxidativen Kapazität (TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) der Plasmabestandteile Albumin (28%) und Harnsäure (20%) an der Gesamtkapazität.

Die erhöhte GSSG-Konzentration in Blutzellen von Patienten wies auf einen verstärkten oxidativen Stress und Beanspruchung der antioxidativen Abwehr hin. Dies widersprach allerdings dem Harnsäureergebnis. Es konnten keine geringeren Harnsäure-Werte nachgewiesen werden, die möglicherweise durch radikalische Prozess verursacht wurden. Der oxidative Stress könnte auch in verschiedenen Kompartimenten (Glutathion in Blutzellen; Harnsäure im Plasma) des Blutes unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Die Bestimmung der Harnsäure schien aufgrund der vielen, möglicherweise überlagernden Faktoren (Aufnahme über Ernährung, radikalischer Abbau und Elimination durch HD) nicht geeignet, Unterschiede zwischen Probanden und HD-Patienten nachzuweisen.

Die Konzentrationen an tGSH und GSSG variierten in der Literatur sehr stark (s. Tabelle 4.4, Faktor 2 für tGSH und Faktor 6 bei GSSG). Dies könnte an den unterschiedlichen Bestimmungsmethoden liegen (kinetischer Assay, kommerzieller Kit mit kinetischem Assay, Derivatisierung und HPLC-Messung).

Tabelle 4.4: Übersicht aus Literatur über tGSH- und GSSG-Konzentrationen im Vollblut von Patienten vor HD und Probanden

Konzentration [μM]	tGSH		GSSG	
	Patienten	Probanden	Patienten	Probanden
Ceballos-Picot et al., 1996	620	766	57	87
Pasaoglu et al., 1996	769	1215	15,2	15,5
Ross et al., 1997	778	1276		
Eiselt et al., 2000	1970	2450		
Tarng et al., 2000a	700	1079	93	75
Eiselt et al., 2001	1400	1950		
Ozden et al., 2002	550	2028		
Tarng et al., 2002		1020		80
eigene Ergebnisse	1040	1170	53	36

Die Literaturwerte für tGSH waren im Blut der gesunden Probanden höher als bei HD-Patienten, wobei die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit etwa im Mittelfeld der Literaturdaten liegen. Die gemessenen GSSG-Konzentrationen waren in guter Übereinstimmung mit der Literatur, wobei die Tendenz zu höheren Werten bei Patienten nicht eindeutig war. Die Bedeutung einer Veränderung von GSH sowie der protektiven Enzyme SOD, CAT und GPx wird in der Literatur kontrovers diskutiert: niedrigere Werte in den Patienten weisen auf einen verringerten Schutz und damit oxidativen Stress hin, höhere Konzentrationen könnten durch eine stressbedingte Induktion erklärt werden. Die Bestimmung von tGSH schien als Marker für oxidativen Stress in dieser Fragestellung und mit dieser Methode nicht besonders wertvoll. Besser geeignet war die Bestimmung von GSSG oder des Verhältnisses von GSSG zu tGSH. Die MDA-Konzentrationen in Blutplasma waren bei Probanden und Patienten ungefähr gleich. In der Literatur zeigten nur Eiselt et al. (2000) ein übereinstimmendes Ergebnis, meistens wurde bei Patienten deutlich höhere Werte nachgewiesen als bei Probanden (s. Tabelle 4.5). Der Vergleich wurde dadurch erschwert, dass die in der Literatur bestimmten Lipidperoxydationsprodukte oft nicht nur MDA, sondern auch andere Aldehyde wie 4-Hydroxynonenal oder TBARS umfassten. Die Werte schwankten etwa um den Faktor 30 bei den Patienten (Vergleich Daschner et al. (1996)/Donica (2001)).

Tabelle 4.5: Übersicht der Literaturdaten über Konzentrationen von LPO-Produkten im Plasma von Patienten vor HD und Probanden; 4-HNE: 4-Hydroxynonenal

Konzentration [μM]	MDA	
	Patienten	Probanden
Eiselt et al. (2000)/TBARS	3,1	3,4
Eiselt et al. (2001)/TBARS	~4	3,05
Dursun et al. (2002)/TBARS	1,5	1,3
Weinstein et al. (2000)/MDA-photometr.	2,37	0,97
Donica (2001)/MDA+4-HNE	10,12	2,02
Usberti et al. (1999); Gerardi et al. (2002); Usberti et al. (2002a); Usberti et al. (2002b)/MDA+4-HNE	~1,6	~0,41
Roob et al. (2000)/MDA-HPLC	0,87	
Daschner et al. (1996)/MDA-HPLC	0,385	0,15
eigene Ergebnisse	1,56	1,65

Die hohen MDA-Werte im Plasma der Probanden in der vorliegenden Arbeit könnten möglicherweise auf erhöhte Blutfettgehalte zurückzuführen sein, da die Probanden bei der Blutentnahme nicht nüchtern waren (Handelman, 2000). Die Ergebnisse für die oxidative Schädigung der Lipide lassen somit keine eindeutige Aussage über die oxidative Belastung des Plasmas zu.

Die M₁dG-Gehalte waren bei den Patienten leicht erhöht, die Level der Probanden lagen im Bereich der Resultate von Leuratti et al. (1999). Dies wies auf eine Auswirkung einer oxidativen Lipid-Schädigung auf die DNA-Ebene oder auf eine oxidative Schädigung des Zucker-Phosphat-Rückgrates der DNA hin.

Bei den Patienten wurden signifikant mehr direkte Strangbrüche festgestellt als bei den Probanden. Diese signifikanten Differenzen wurden allerdings als wenig relevant angesehen, da die Schwankungen der Einzelwerte im Vergleich zu den Unterschieden der Mittelwerte relativ groß waren. Die oxidative DNA-Schädigung waren bei Patienten im Vergleich zu den Probanden hochsignifikant verstärkt bei sehr deutlichen Differenzen der Mittelwerte.

Differenzen in der DNA-Schädigung in Leukozyten von Patienten vor HD und Probanden fanden auch Stopper et al. (2001), wobei die tail intensities mit 11TI% für Probanden und 17TI% für Patienten deutlich größer waren. Diese Diskrepanz war auf methodische Variationen zurückzuführen: Stopper et al. führten die Elektrophorese mit einer größeren Feldstärke durch (1,14V/cm im Vergleich zu 0,89V/cm), womit der Assay empfindlicher wurde. Außerdem wurde eine andere Bildanalysesoftware verwendet, die auch einen Einfluss auf das Ergebnis hat. Kan et al. (2002) fanden ebenfalls signifikant weniger DNA-Strangbrüche im Comet Assay in Leukozyten von Probanden als von HD-Patienten, allerdings wurde eine andere Auswertungsart (visuelle Einteilung der Kometen in 4 Schadensklassen) verwendet, die eine Gegenüberstellung des Ausmaßes der Schädigung unmöglich machte.

4.2.2 Patienten während HD

4.2.2.1 Harnsäure-Bestimmung

Die Ergebnisse der Harnsäure-Bestimmung der während der HD entnommenen Blutproben wurde in Abbildung 4.15 dargestellt. Bis 10 Minuten nach Ende der HD nahmen die Konzentrationen der antioxidativ wirksamen Harnsäure auf etwa 30% der Ausgangswerte ab (von 310 μM auf 100 μM). 20 Minuten nach Ende der HD war wieder ein leichter Anstieg zu erkennen.

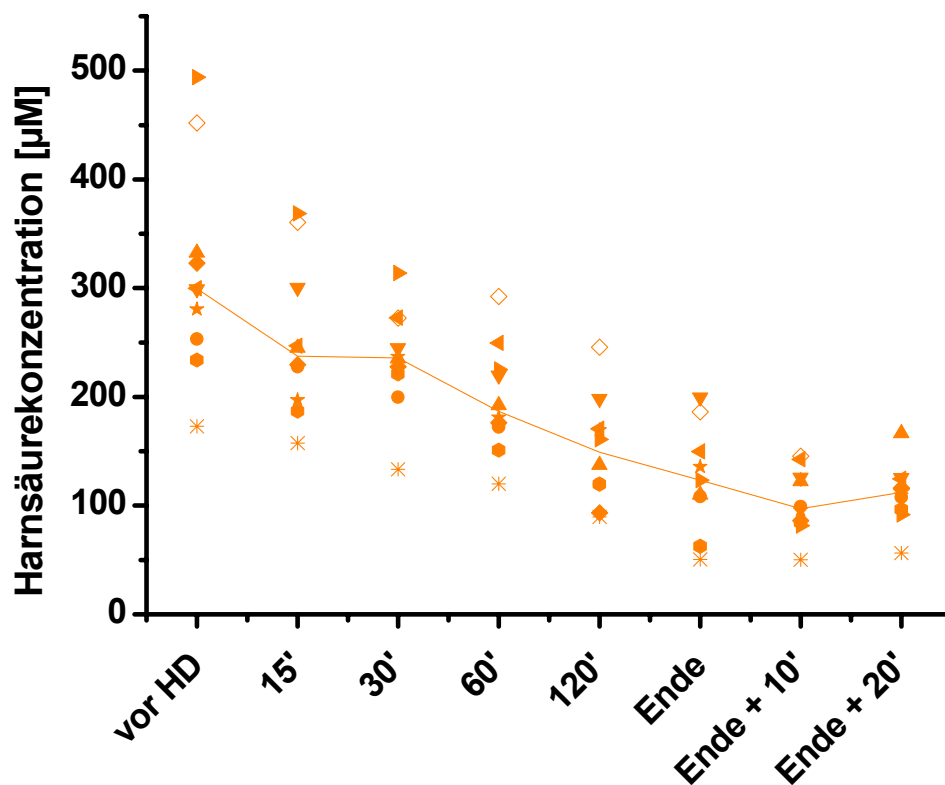


Abbildung 4.15: Harnsäurekonzentration [μM] im Plasma von Patienten (Mediane, n=10) im Verlauf der HD

4.2.2.2 Glutathion-Bestimmung

Die Ergebnisse der HD-begleitenden Untersuchungen des GSSG- und tGSH-Gehaltes wurden in Abbildung 4.16 gezeigt. Im Verlauf der HD kam es zu einer signifikanten Abnahme von tGSH um etwa 9% bis 60 Minuten nach Dialysebeginn (absolut etwa 93 μM) und dann zu einer Zunahme bis 10 Minuten nach Ende der HD (Signifikanz: vor HD/60', 60'/Ende + 10': $p < 0,02$, Wilcoxon-Test). Die Ausgangswerte wurden im beobachteten Zeitraum auch nach HD nicht mehr ganz erreicht. Die GSSG-Konzentration war zu allen Zeitpunkten während

und nach HD (außer 120') signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Werten vor HD (Signifikanz: $p < 0,05$, Wilcoxon-Test). Der GSSG-Spiegel nahm zwischen den Zeitpunkten „vor HD“ und „60'“ um etwa 20% (absolut etwa $12\mu\text{M}$) ab. Der errechnete GSH-Status schwankte zwischen 89% und 91%.

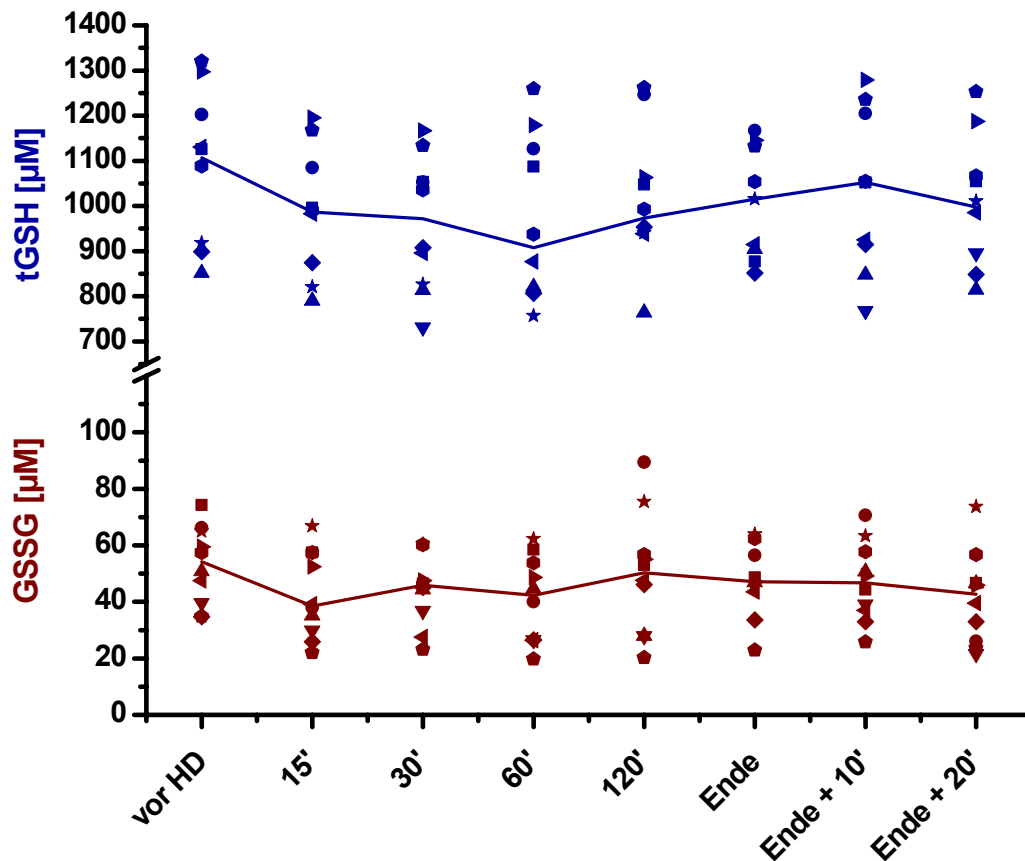


Abbildung 4.16: Konzentrationen [μM] von GSSG und tGSH im Vollblut von Patienten (Mediane, $n=10$) während der HD

4.2.2.3 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

Die Mediane der direkten DNA-Schäden schwankten im Verlauf der HD zwischen 0,4 und 0,6 TI%. Betrachtete man die Werte für die einzelnen Patienten, so war keine Zeitabhängigkeit zu erkennen.

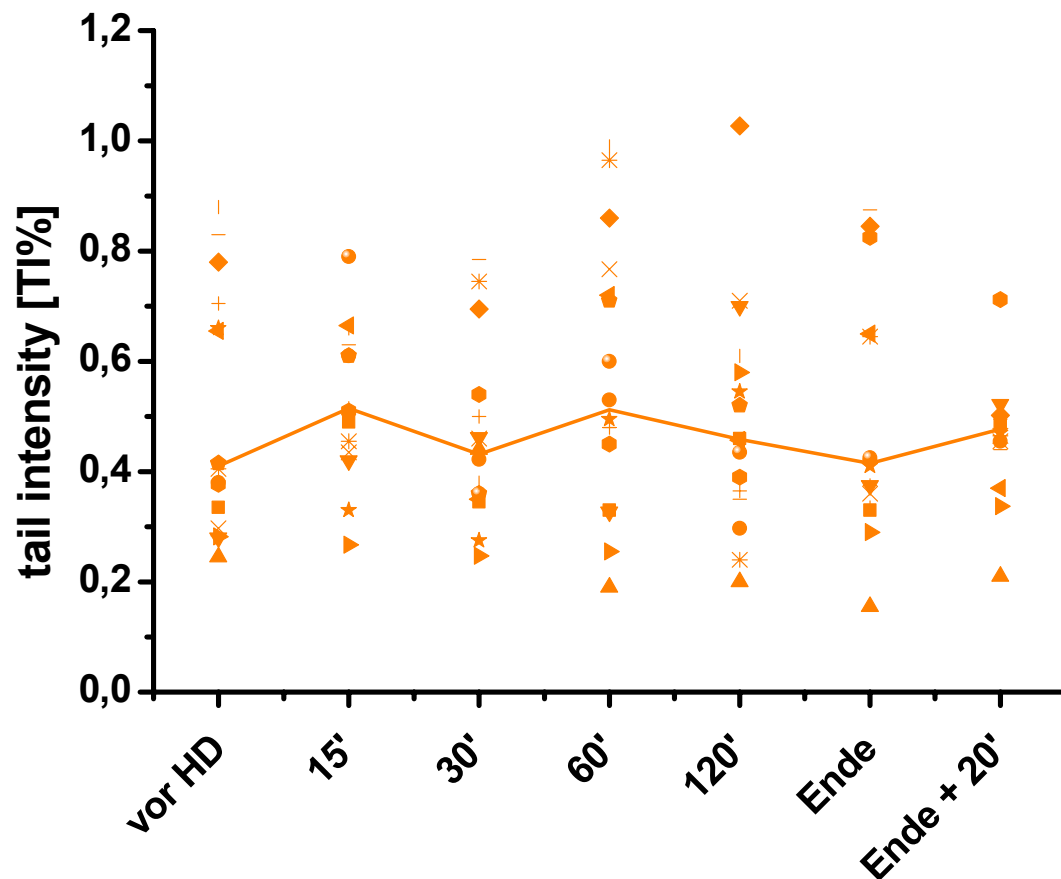


Abbildung 4.17: DNA-Schäden in Leukozyten von Patienten (Mediane, n=15-16) im Verlauf der HD

Die oxidativen DNA-Schäden variierten im Median zwischen 4 und 8 TI% (s. Abbildung 4.18), wobei hier eine starke interindividuelle Schwankung (2 bis 28 TI%) zu erkennen war. Es wurde ebenfalls kein zeitabhängiges Muster beobachtet.

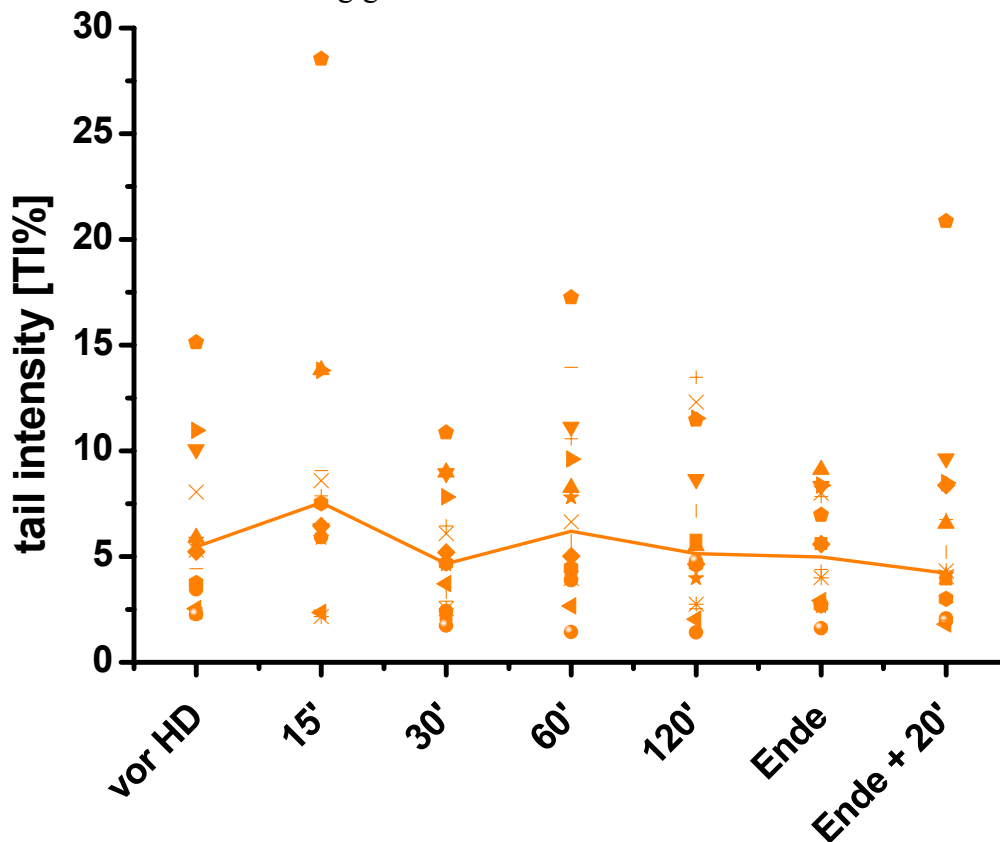


Abbildung 4.18: Oxidative DNA-Schäden in Leukozyten von Patienten (Mediane, n=14-16) im Verlauf der HD

4.2.2.4 Diskussion

Die starke Verminderung der Harnsäure im Verlauf der HD auf etwa 30% der Ausgangskonzentration (von 310 μM auf 100 μM) ist durch die kleine Molekülmasse und die gute Hydrophilie zu erklären und stimmt gut mit Literaturdaten überein. Eine starke Elimination wurde auch von Ha et al. (1996; von 423 μM vor auf 123 μM nach HD), von Jackson et al. (1995; von 398 μM vor auf 136 μM nach HD) und von Usberti et al. (2002a; 452 μM vor auf 202 μM nach HD) festgestellt. Die Schwankung der Ausgangswerte ist mit den über die Ernährung aufgenommenen Vorläufern von Harnsäure über Purin-reiche Lebensmittel zu erklären. Nach Ende der HD könnten die Werte wieder durch die Syntheseleistung der Leber oder durch eine Diffusion aus anderen Körpergeweben ins Blutplasma angestiegen sein.

Die GSSG-Gehalte nahmen in den ersten 15 Minuten der HD, die tGSH-Konzentrationen in den ersten 60 Minuten ab. Zum Ende der HD wurden wieder ansteigende Werte für tGSH beobachtet, die aber die Ausgangswerte nicht wieder erreichten. Dies stimmte mit Ergebnis-

sen von Daschner et al. (1996) überein, die auch leicht erniedrigte Werte nach HD feststellten. Diese Verringerung ähnelte der kontinuierlichen Elimination der Harnsäure aus dem Plasma. Da sich tGSH/GSSG und Harnsäure in unterschiedlichen Blutbestandteilen befanden, konnte bei tGSH/GSSG nicht von einer Elimination über die HD-Membran ausgegangen werden. Die Abnahme von GSH könnte durch eine Depletion durch reaktive elektrophile Moleküle erklärbar sein. Bei den Elektrophilen könnte es sich um neu gebildete, reaktive LPO-Produkte handeln. Die Verringerung des GSSG-Gehaltes könnte durch eine Reduktion durch die GSR zur Aufrechterhaltung des GSSG/tGSH-Verhältnisses verursacht worden sein. Der Anstieg der tGSH-Konzentration gegen Ende der HD könnte durch eine induzierte Neusynthese von GSH bewirkt worden sein. Einen weiteren Hinweis auf einen Verbrauch von GSH durch Abfangreaktionen lieferte die Abnahme von tGSH und GSSG um unterschiedliche Mengen bei fehlender Rotfärbung des Blutplasmas durch Hämolyse der Erythrozyten: Eine Lyse der Erythrozyten, die den größten Anteil des tGSH im Blut enthielten, könnte auch eine Verringerung der tGSH- und GSSG-Konzentrationen verursachen.

Die Abnahme von tGSH deutet auf einen während der HD induzierten oxidativen Stress in den Blutzellen hin, da Roob et al. (2000) keine Zunahme von Plasma-MDA während der HD beobachteten. Sowohl die HD als auch die damit verbundene Verringerung der tGSH-Konzentration schien keinen Einfluss auf das Ausmaß der (oxidativen) DNA-Schädigung im Blut zu haben. Sie veränderten sich zu keinem Zeitpunkt der HD deutlich im Vergleich zu den Werten vor HD. Die Veränderung des tGSH-Gehaltes wirkte sich nicht auf die oxidativen DNA-Schäden aus. Dies könnte auf den nahezu konstanten GSH-Status zurückzuführen sein, sodass noch ausreichend Schutz vorhanden war.

4.2.3 Untersuchung des Einflusses der Dialysemembranen

Da ein Einfluss der Dialysemembran auf den oxidativen Stress in dem bisherigen Studiendesign aufgrund zu starker interindividueller Schwankungen oder zu kleiner Gruppen nicht beobachtet werden konnte, wurde zur weiteren Untersuchung dieser Fragestellung ein Cross Over Design gewählt. Hierbei wurden die Patienten je vier Wochen mit einer synthetischen Polysulfon- (Fresenius F8), einer halbsynthetischen, diacetylierten Cellulose- (Baxter DICEA 170) und einer halbsynthetischen, Vitamin E-beschichteten Cellulosemembran (Terumo E15) dialysiert. Nach einer zweiwöchigen Adaptionsphase wurde in den letzten beiden Wochen jeweils zwei- bis dreimal zu verschiedenen Zeitpunkten der HD Blut entnommen und sowohl in den Blutzellen auf oxidative DNA-Schäden als auch im Plasma auf MDA-Bildung geprüft.

Die direkten DNA-Schäden wurden nur vor HD bestimmt, da sie im Verlauf der HD verglichen mit den Schwankungen der oxidativen DNA-Schäden nur ein geringes Ausmaß besaßen (s. Kapitel 4.2.2.3). Bei diesem Versuchsdesign wurden die Ergebnisse der drei Membranen für jeden Patienten miteinander verglichen und damit ein Signifikanztest durchgeführt. So wurden die interindividuellen Schwankungen für die statistische (gepaarte) Betrachtung eliminiert.

4.2.3.1 Malondialdehyd-Bestimmung

Die MDA-Gehalte im Plasma von HD-Patienten blieben nahezu konstant (s. Abbildung 4.19) bei der Verwendung der Fresenius F8 (Schwankungsbreite über alle Patienten und Zeitpunkte: 0,22-3,23 μ M; Median: 1,21 μ M) und der Terumo E15 (Schwankungsbreite über alle Patienten und Zeitpunkte: 0,88-4,44 μ M; Median: 1,33 μ M). In der zweiten Dialysehälfte zeigten sich ansteigende MDA-Gehalte bei HD mit Baxter DICEA 170 (Schwankungsbreite über alle Patienten und Zeitpunkte: 0,11-4,24 μ M; Median: 1,66 μ M).

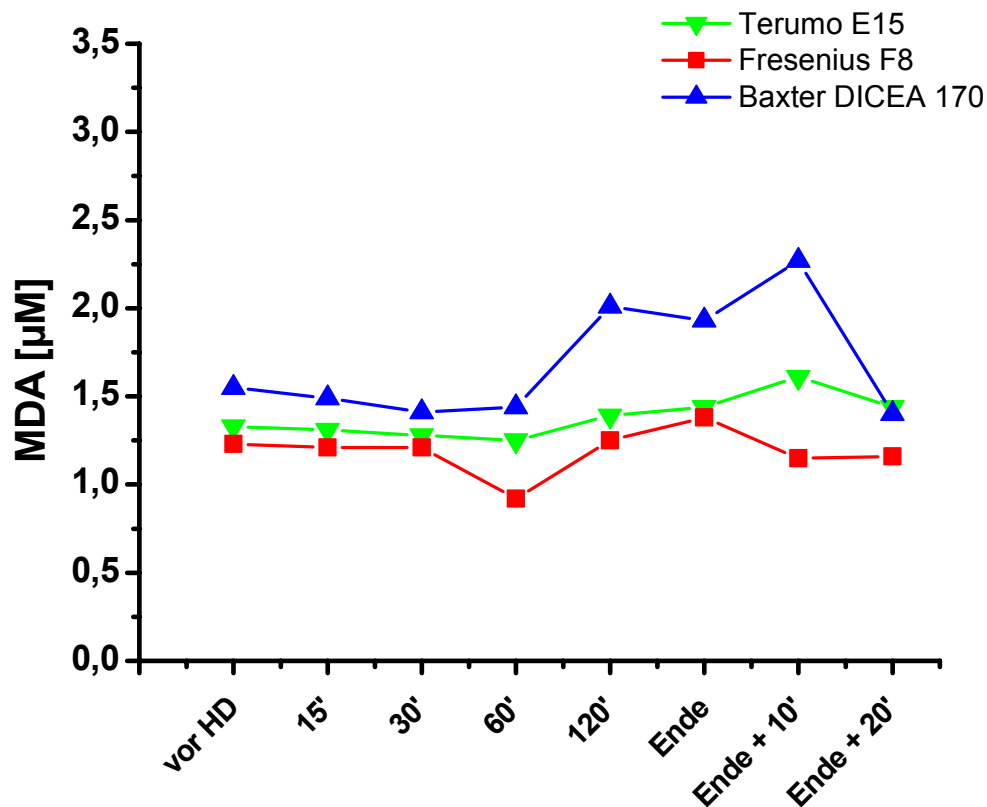


Abbildung 4.19: MDA im Plasma von Patienten (Mediane, n=7) im Verlauf der HD (Cross Over Studie)

4.2.3.2 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

In Abbildung 4.20 wurde die (oxidative) DNA-Schädigung im Verlauf der HD bei Verwendung der verschiedenen Membranen dargestellt. Die direkten DNA-Schäden lagen vor HD im Bereich der Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1.5. Während der HD zeigten sich unterschiedliche Schädigungsprofile (mit FPG): die Mediane für die Baxter DICEA 170 (Schwankungsbreite über alle Patienten und Zeitpunkte: 1,5-10,7TI%) lagen immer höher als für die anderen Dialysatoren: Fresenius F8 (Schwankungsbreite über alle Patienten und Zeitpunkte: 2,1-8,3TI%), Terumo E15 (Schwankungsbreite über alle Patienten und Zeitpunkte: 1,2-8,9TI%). Die Mediane über alle Patienten und Zeitpunkte waren für Baxter DICEA 170: 5,5TI%, für Fresenius F8: 4,4TI% und für Terumo E15: 4,6TI%. Statistische Betrachtungen ergaben signifikante Unterschiede für Terumo E15/Baxter DICEA 170 ($p=0,0002$; Wilcoxon-Test) und für Fresenius F8/Baxter DICEA 170 ($p=0,001$; Wilcoxon-Test), wohingegen Fresenius F8 und Terumo E15 identisch waren ($p=0,97$; Wilcoxon-Test).

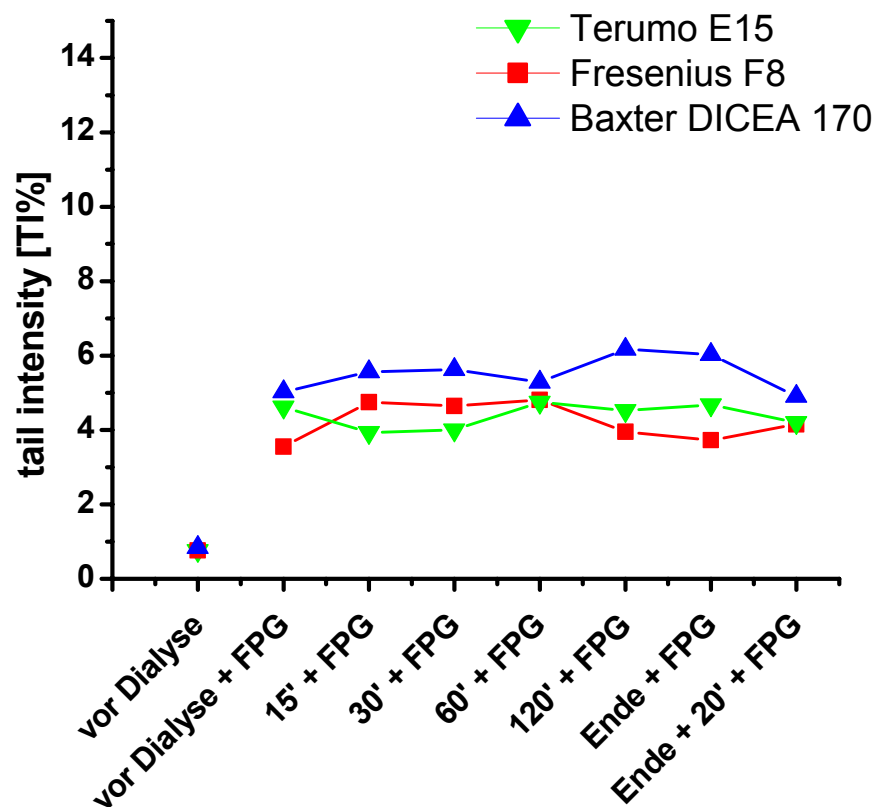


Abbildung 4.20: (Oxidative) DNA-Schäden in Leukozyten von Patienten (Mediane, n=9) im Verlauf der HD (Cross Over Studie)

4.2.3.3 Diskussion

Die Bestimmung der MDA-Gehalte im Plasma zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den Membrantypen. Tsuruoka et al. (2002) detektierten weniger TBARS (10 Patienten) nach 36 Dialysen (12 Wochen) mit einer Terumo E15 als mit einer nicht mit Vitamin E-beschichteten Cellulosemembran. Dieser Effekt der Vitamin E-Beschichtung gegenüber einer diacetylierten Cellulosemembran wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt. Ein Grund hierfür könnte der unbestimmte Ernährungsstatus der Patienten sein.

Bei der Untersuchung der oxidativen DNA-Schädigung stellte sich heraus, dass die synthetische Fresenius F8 und die Vitamin E-beschichtete Terumo E15 eine vergleichbare Zahl an Strangbrüchen aufgrund oxidierteter Basen verursachten. Sie induzierten signifikant weniger Strangbrüche als die halbsynthetische Baxter DICEA 170, weshalb die beiden erstgenannten angesichts der langfristigen Auswirkungen des oxidativen Stresses – wie Atherosklerose oder Krebs – besser geeignet zu sein scheinen. Dies bestätigten Ergebnisse von Tarng et al. (2000a), die Membranwechsel von Cellulosemembranen zu synthetischen PSu- und PMMA-Membranen mit acht Patienten durchführten und nach einer zweiwöchigen Adaption signifikant niedrigere 8-OH-dG-Gehalte (in Leukozyten-DNA) bei Verwendung von synthetischen Membranen vor HD detektierten. In einer weiteren Studie fanden Tarng et al. (2000b) vor HD etwa identische 8-OH-dG-Werte bei HD mit Terumo E15 und mit einer PSu-Membran (16,8 und 18,6 8-OH-dG/10⁶dG). Mit einer Cellulosemembran wurden signifikant höhere Werte gefunden (30,4 8-OH-dG/10⁶dG). Bei Untersuchung von Membranwechseln ergaben sich nach vier und acht Wochen signifikant niedrigere 8-OH-dG-Werte durch Wechsel von Cellulose- auf PSu- oder Terumo E15-Membranen und wieder höhere Werte nach Wechsel auf die Cellulosemembran.

Die hier verwendete PSu-Membran hatte trotz der größten Oberfläche und dem damit verbundenen starken Blut-Membran-Kontakt den geringsten Einfluss auf den oxidativen Stress. Dies deutet auf die hohe Biokompatibilität dieses Materials hin und bestätigte Ergebnisse, bei denen die Komplementaktivierung von PSu- und halbsynthetischen Membranen verglichen wurden (Bowry, 2002; Clark et al., 2002).

4.2.4 Einfluss der Anämiebehandlung mit Ferrlecit®

Die bei den HD-Patienten vorhandene Anämie wurde mit intravenöser Eisengabe behandelt. Dabei wurde einmal wöchentlich eine Fe(III)-Lösung (als Gluconat-Komplex, Ferrlecit®) fünf

Minuten vor Ende der HD als Bolus injiziert. Um gleichzeitig individuelle oder membranbedingte Variationen zu minimieren, wurde den Patienten nach dem in Abbildung 4.21 abgebildeten Schema Blut entnommen. Verglichen wurde die (oxidative) DNA-Schädigung und die Bildung von MDA bei einer HD mit Eisen- und bei einer HD ohne Eisen-Infusion.

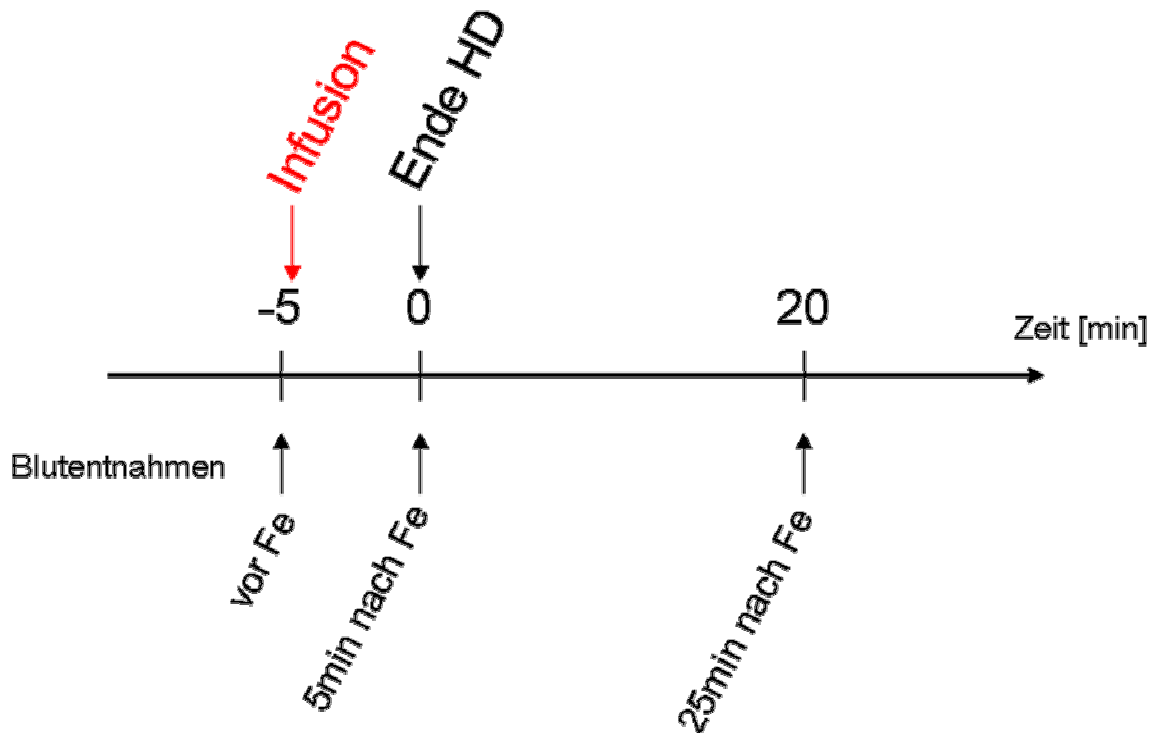


Abbildung 4.21: Zeitschema der Ferrlecit®-Infusion und der Blutentnahmen

4.2.4.1 Malondialdehyd-Bestimmung

An den beiden Dialysetagen ergaben sich für den Zeitpunkt „vor Fe“ nahezu identische MDA-Werte im Plasma. Die MDA-Gehalte zeigten innerhalb der 25 Minuten bei der HD ohne Eisen-Infusion keine Veränderung (s. Abbildung 4.22). Die HD mit Eisen-Infusion wies in diesem Zeitraum dagegen eine deutliche Erhöhung der MDA-Gehalte im Mittel um etwa 60% auf. Die Plasma-MDA-Konzentrationen waren bei HD mit Eisen-Infusion sowohl zum Zeitpunkt „5min nach Fe“ als auch zum Zeitpunkt „25min nach Fe“ signifikant erhöht zur HD ohne Eisen-Infusion und zum Zeitpunkt „vor Eisen“. Nach 25 Minuten war wieder ein geringer Abwärtstrend zu erkennen.

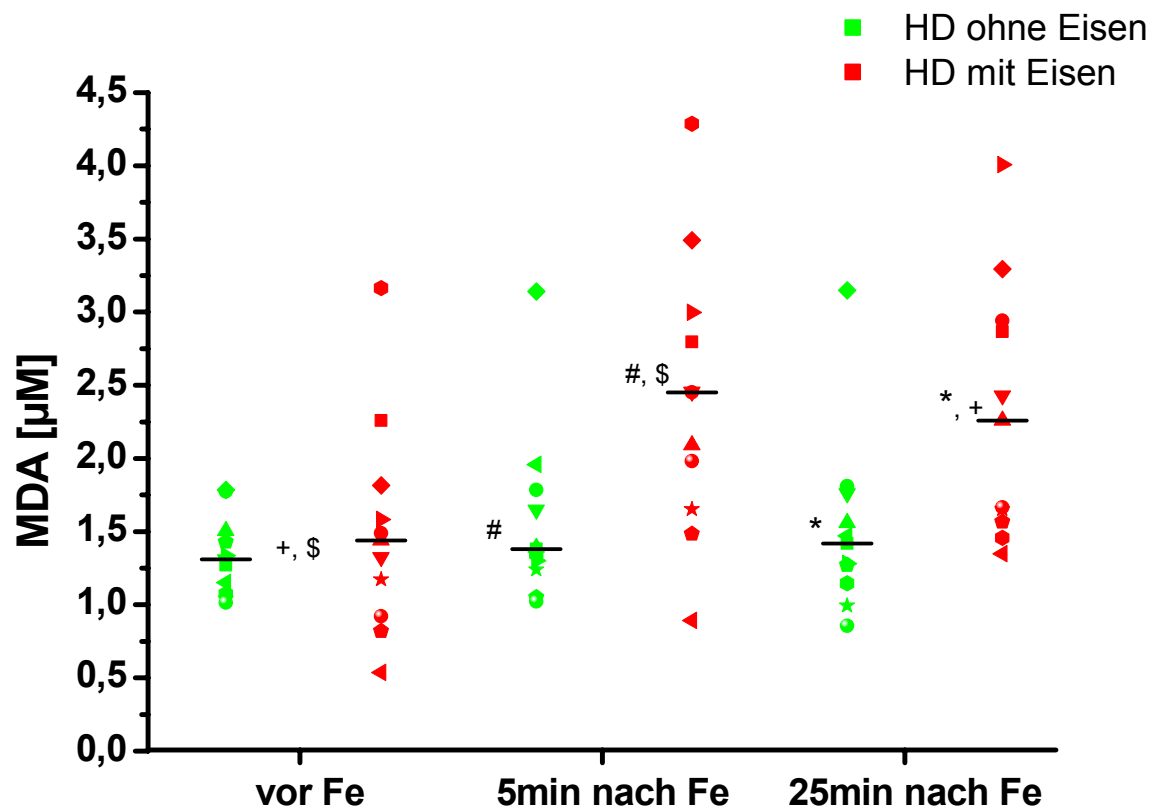


Abbildung 4.22: MDA im Plasma von Patienten bei HD ohne und mit Eisen-Infusion (n=11); Signifikanz: *: $p < 0,005$; #: $p < 0,03$; \$,+: $p < 0,01$, Wilcoxon-Test

4.2.4.2 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

Die Messung der direkten DNA-Schädigung zeigte keine Veränderungen über die beobachtete Zeit oder Unterschiede zwischen der HD mit und ohne Eisen-Infusion (s. Abbildung 4.23). Die oxidativen DNA-Schäden waren zum Zeitpunkt „vor Fe“ an den beiden Versuchstagen identisch und verringerten sich leicht bei HD ohne Eisen-Infusion im Verlauf der 25 Minuten. Bei der HD mit Eisen-Infusion nahm die oxidative DNA-Schädigung dagegen bis „25min nach Fe“ um ungefähr 20% zu. Zu diesem Zeitpunkt war der oxidative DNA-Schaden signifikant erhöht zur HD ohne Eisen-Infusion.

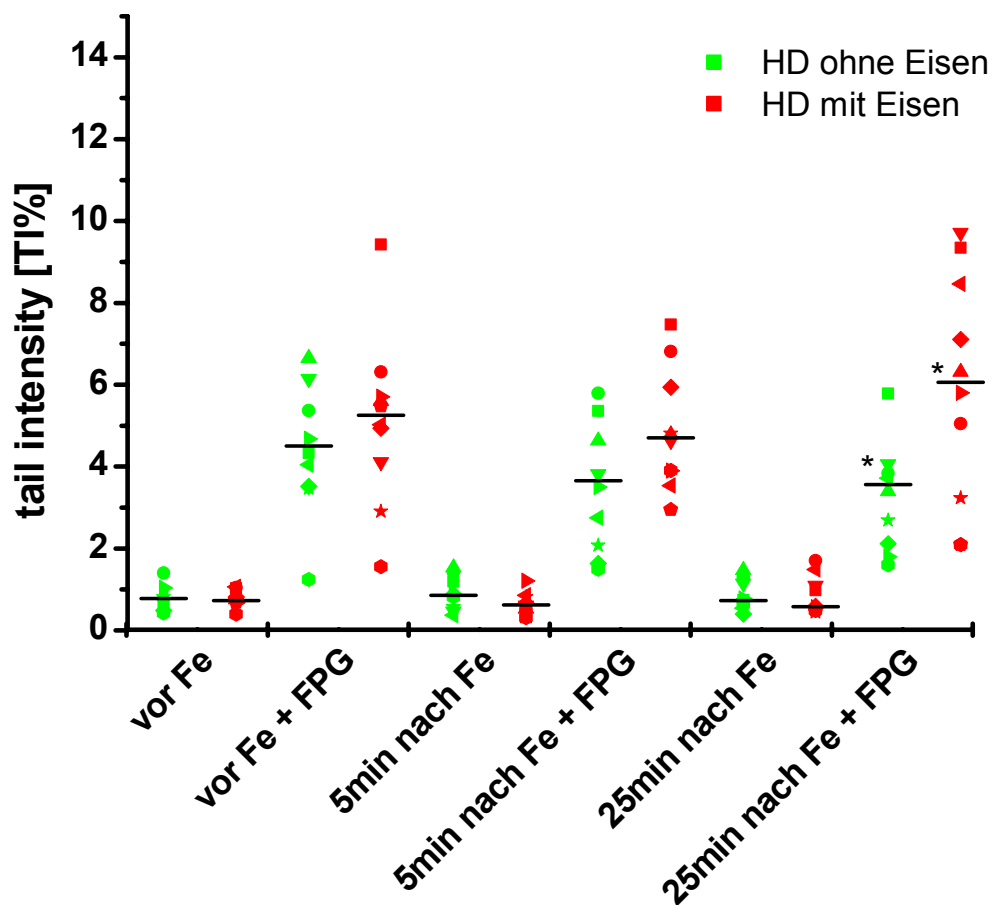


Abbildung 4.23: (Oxidative) DNA-Schäden in Leukozyten von Patienten bei HD ohne und mit Eisen-Infusion (n=10); Signifikanz: *: $p < 0,001$, Wilcoxon-Test

4.2.4.3 Diskussion

An den beiden Untersuchungstagen (HD mit und ohne Eisen) zeigten sowohl der Gehalt an MDA im Plasma als auch die (oxidative) DNA-Schädigung übereinstimmende Werte „vor Fe“. Dies deutete auf eine gute Stabilität der untersuchten Patienten hin.

Die schnelle und deutliche Erhöhung der MDA-Gehalte bei HD mit Eisen-Infusion wies auf einen starken, durch Eisen(III) induzierten oxidativen Stress hin. Dies lag daran, dass das eisenabfängende Transferrin bei der kurzen Infusionsdauer übersättigt wurde (Zanen et al., 1996). Das freie Eisen(III) ist bekannt über die Fentonreaktion ROS zu generieren (s. Kapitel 2.1), die dann die Schädigung von Lipiden durch LPO initiierten. Roob et al. (2000) fanden in einem Zeitraum von 30 Minuten bis drei Stunden nach Infusion einer Eisen-Hydroxid-Saccharose-Komplex-Lösung eine starke Transferrinübersättigung, die zu freiem Eisen im Plasma (BDI) und erhöhten Plasma-MDA-Gehalten führte. Die Maxima lagen beim ersten untersuchten Zeitpunkt 30 Minuten nach Infusion. Dagegen berichteten Parkkinen et al. (2000) von einem Maximum an freiem Eisen fünf Minuten nach Infusion (Eisen-Hydroxid-Saccharose-Komplex-Lösung) und von einem größeren Maximum nach 3,5 Stunden. Bei den eigenen Untersuchungen war eine weitere Verfolgung der Schädigungskinetik durch das Ende der HD begrenzt.

Die Induktion dieses oxidativen Stresses machte sich auch auf der DNA-Ebene bemerkbar. Hier wurde ebenfalls schon fünf Minuten nach Infusion ein leichter Anstieg der oxidativen DNA-Schädigung und nach 25 Minuten eine deutliche Verstärkung beobachtet. Die maximale Schädigung scheint auf der Lipid-Ebene schon fünf Minuten nach Infusion erreicht zu sein, wohingegen die DNA-Oxidation durch das untersuchte Intervall hindurch anstieg. Dieses verzögerte Auftreten der DNA-Oxidation lag am Entstehungsort des oxidativen Stresses: bevor die hochreaktiven ROS die DNA erreichten, konnten sie mit einer Reihe unterschiedlicher Moleküle abreagieren: Plasmaproteine, Leukozytenmembran und -zytoplasma mit seinen antioxidativen Schutzmechanismen, Kernmembran und Histone.

Um den Beitrag der Eisen-Infusionen am oxidativen Stress zu minimieren, wurden mehrere Möglichkeiten wie z. B. die Gabe von mehreren kleinen Infusionen diskutiert, die an den verschiedenen Tagen appliziert wurden, um die Transferrinübersättigung zu unterbinden (Parkkinen et al., 2000). Roob et al. (2000) verminderten durch oral verabreichtes Vitamin E die LPO und freies Eisen (BDI). Somit ist vielleicht hier ein Antioxidantieneinsatz sinnvoll. Eine weitere, einfache Möglichkeit ist, Eisen nicht in den venösen Schlauch der HD-Apparatur, der direkt in den Körper eintritt, sondern in den arteriellen Schlauch zu infundieren. Dadurch können freie Eisenionen und Eisenkomplexe geringer Molekulargröße das Blut direkt über den Dialysator wieder verlassen, wohingegen die hochmolekularen Anteile der Präparate im Blut bleiben und langsam ihren Eisenanteil abgeben (Gupta, 2000).

4.3 Lebererkrankungen und Molecular Adsorbent Recycling System (MARS)

In diese Untersuchungen wurden vier Patienten mit akutem Leberversagen einbezogen, die mit der MARS-Therapie behandelt wurden. Jede Behandlung dauerte acht Stunden und wurde ein- oder zweimal wiederholt. Die Grunderkrankungen waren alkoholbedingte Hepatopathie und Multiorganversagen (s. Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Patienten mit akutem Leberversagen

Patient	Alter	MARS- Behandlungen	Grunderkrankung
1	48	2	alk. Hepatopathie
2	60	3	alk. Hepatopathie
3	35	2	alk. Hepatopathie
4	64	3	Multiorganversagen

4.3.1 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

Zu verschiedenen Zeiten der Behandlung (vor MARS, 15', 30', 60', 3h, 6h nach Beginn und am Ende) wurde Blut entnommen und auf (oxidative) DNA-Schäden geprüft.

Patient 1 wurde zweimal mit dem Leberersatzverfahren behandelt (rote und grüne Balken, s. Abbildung 4.24). Die oxidativen DNA-Schäden zeigten mit Werten um 2TI% nur ein geringes Ausmaß. Im Verlauf einer achtstündigen MARS-Behandlung kam es weder zu einem starken Anstieg der direkten DNA-Schäden, noch der oxidativen DNA-Schäden. Auch zeigte ein Vergleich der beiden Behandlungen keine Unterschiede.

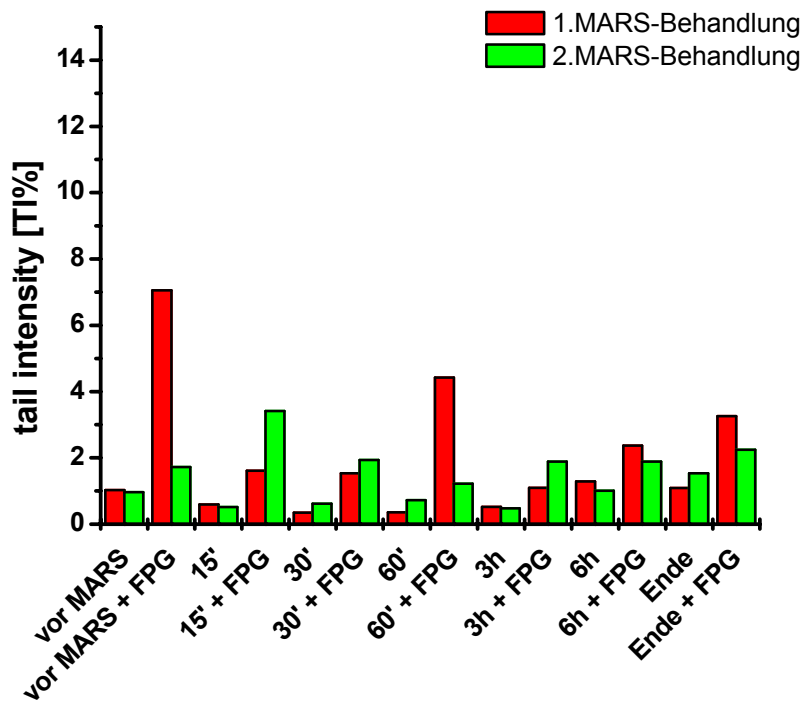


Abbildung 4.24: (Oxidative) DNA-Schäden während der MARS-Behandlung bei Patient 1

Patient 2 wurde dreimal der MARS-Behandlung unterzogen. Die oxidativen DNA-Schäden lagen mit 6TI% deutlich über denen von Patient 1 (s. Abbildung 4.25). Auch war zur dritten Behandlung ein weiterer Anstieg zu erkennen (um 10TI%).

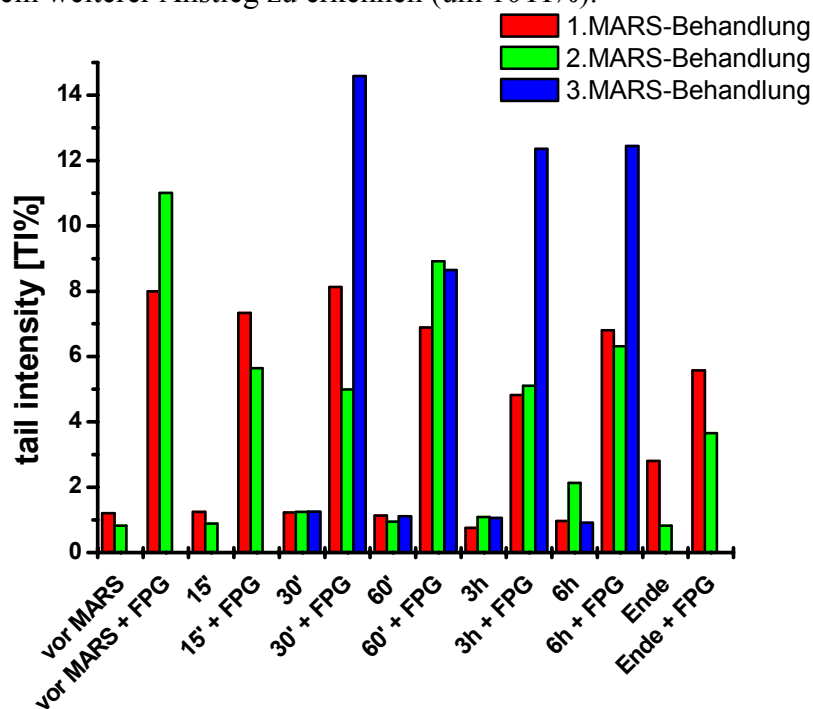


Abbildung 4.25: (Oxidative) DNA-Schäden während der MARS-Behandlung bei Patient 2

Auch bei dem zweimal leberdialysierten Patienten 3 war ein Verstärkung der oxidativen DNA-Schäden bei der zweiten Behandlung auf 8TI% erkennbar (s. Abbildung 4.26).

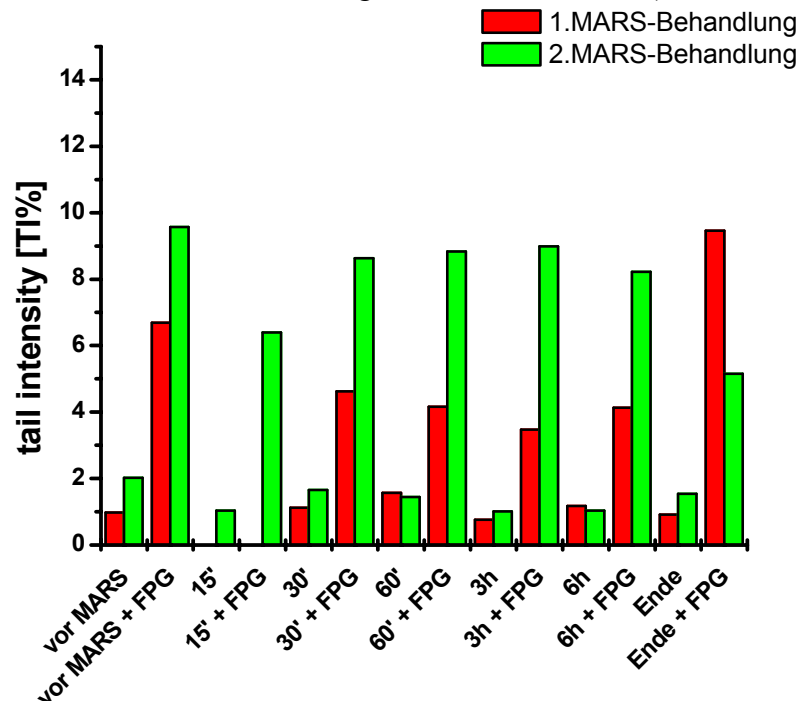


Abbildung 4.26: (Oxidative) DNA-Schäden während der MARS-Behandlung bei Patient 3

Bei Patient 4 lagen die oxidativen DNA-Schäden um 3TI% bei allen drei Behandlungen (s. Abbildung 4.27). Die drei Behandlungstage zeigten keine deutlichen Unterschiede.

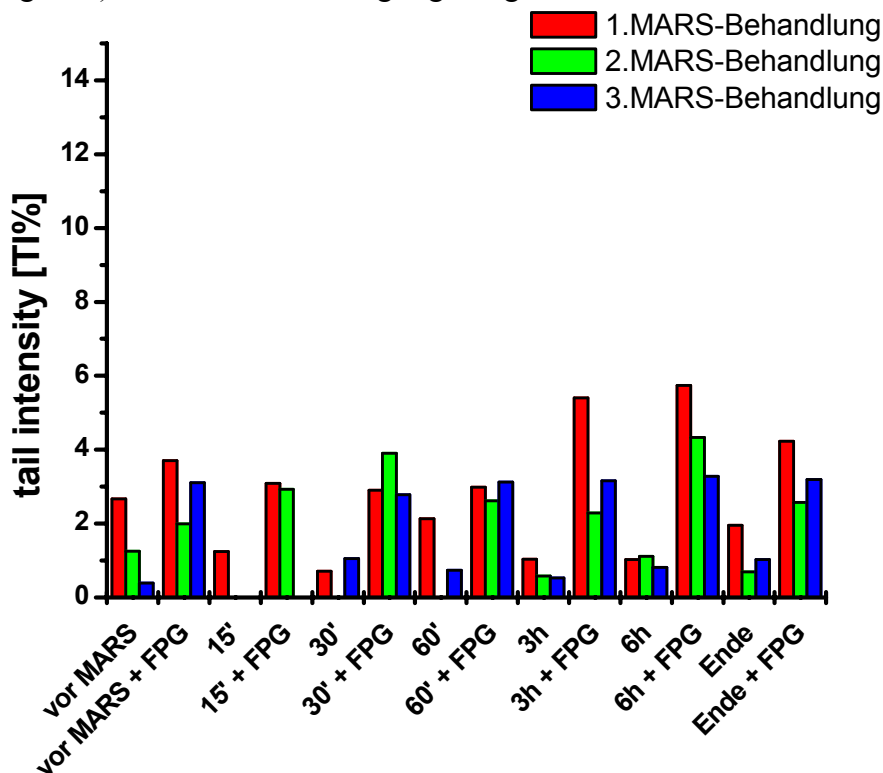


Abbildung 4.27: (Oxidative) DNA-Schäden während der MARS-Behandlung bei Patient 4

In Abbildung 4.28 wurden die Ergebnisse der MARS-Patienten vor Behandlung mit Ergebnissen von Schwarz (2001) verglichen, die Patienten mit chronischer, alkoholbedingter Hepatopathie untersuchte. Es wurden höhere Werte der direkten und auch der oxidativen DNA-Schäden bei den MARS-Patienten festgestellt, sieht man von den beiden extremen Werten bei den Patienten mit alkoholbedingter Hepatopathie ab.

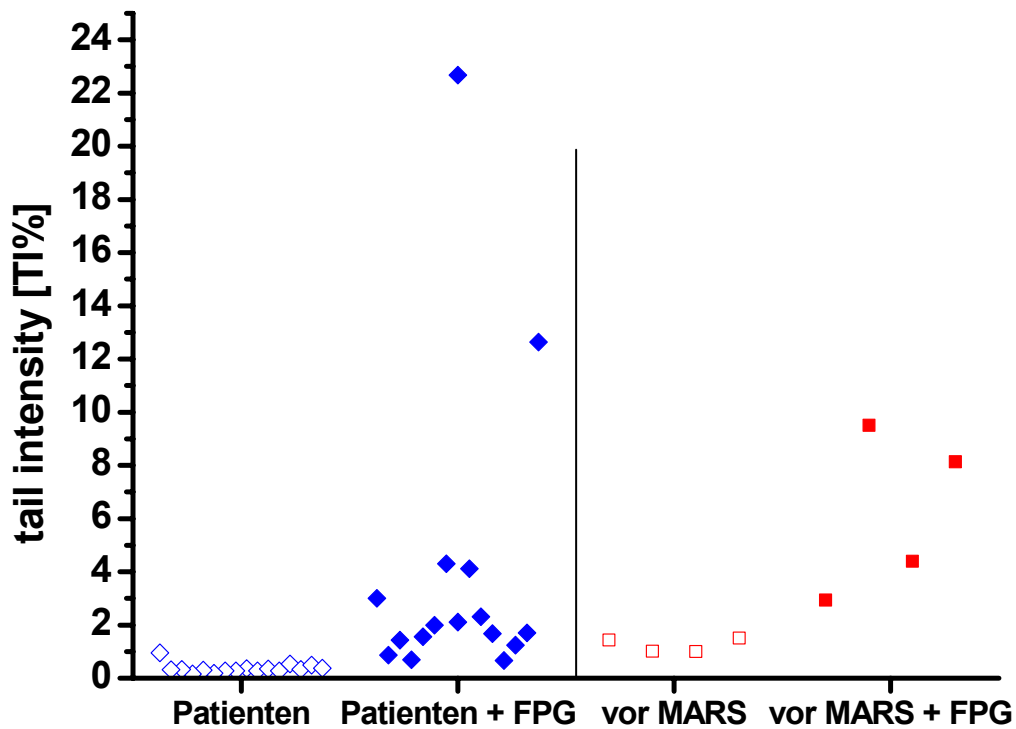


Abbildung 4.28: Vergleich der (oxidativen) DNA-Schäden von Patienten mit alkoholbedingter Hepatopathie (n=16; Daten von Schwarz, 2001) und Patienten vor MARS-Behandlung

4.3.2 Diskussion

Innerhalb der leberdialysierten Patienten zeigten zwei Patienten geringe oxidative DNA-Schäden (2-3TI%; Patient 1, 4) und zwei Patienten größere Schäden (6-8TI%; Patient 2, 3). Bei diesen Patienten mit den höheren Schäden war die Krankheit so schwerwiegend, dass sie einige Tage nach den Behandlungen verstarben. Ob sich die Bestimmung der oxidativen DNA-Schäden mit dem Comet Assay zur Ergänzung diagnostischer/prognostischer Parameter anbietet, ist durch Untersuchungen eines größeren Patientenkollektivs abzuklären. Während der MARS-Behandlung wurden, wie bei der HD (s. Kapitel 4.2.2), kaum zusätzliche oxidative DNA-Schäden induziert. Diese Untersuchungen sollten aber noch mit weiteren Endpunkten (MDA, tGSH/GSSG) fortgeführt werden.

Der Vergleich der (oxidativen) DNA-Schäden der Patienten mit alkoholbedingter Hepatopathie, zeigt jeweils mit und ohne FPG mehr Schäden bei den MARS-Patienten (vor Behandlung), wahrscheinlich aufgrund des akuten Leberversagens und der damit verbundenen Effekte auf den gesamten Körper.

4.4 Patienten nach Nierentransplantation

Ein weiteres Nierenersatzverfahren, neben der HD, ist die Nierentransplantation (NT), bei der es ebenfalls zu oxidativem Stress kommt (Halliwell & Gutteridge, 1999). Untersucht wurden Patienten, die im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen im Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern behandelt wurden.

4.4.1 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

In Abbildung 4.29 wurde der Vergleich der (oxidativen) DNA-Schädigung in Leukozyten von Probanden, Patienten vor HD und Transplantations-Patienten dargestellt. Die direkte DNA-Schädigung war in den Transplantations-Patienten signifikant höher als in den HD-Patienten und den Probanden. Auch ergab sich nach Nierentransplantation ein starker und signifikant erhöhter oxidativer Schaden (Mittelwert: 8,9TI%) im Vergleich zu Patienten vor HD (Mittelwert: 5,4TI%) und Probanden (Mittelwert: 0,7TI%). Allerdings waren bei den Transplantations-Patienten die interindividuellen Unterschiede sehr groß (Schwankungsbreite: 2,5 - 19TI%).

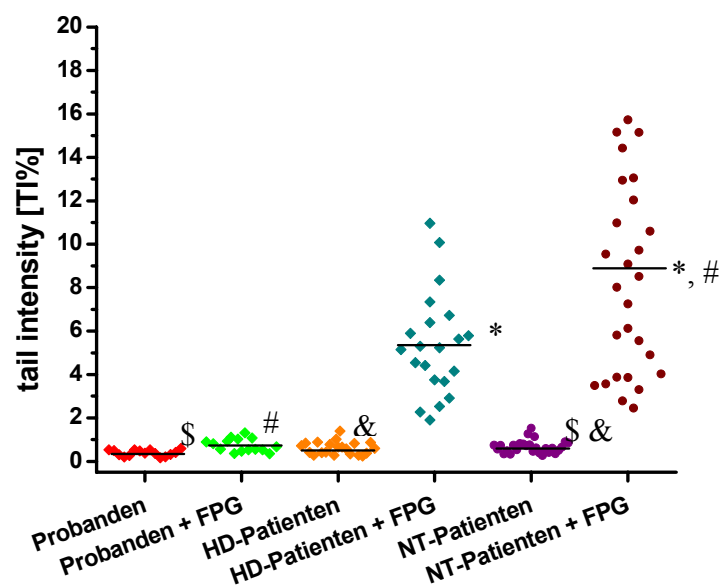


Abbildung 4.29: Vergleich der (oxidativen) DNA-Schäden von Probanden (n=15), Patienten vor HD (n=21) und NT-Patienten (n=29); Signifikanz: *: $p < 0,02$; \$, &: $p < 0,001$; #: $p < 10^{-7}$, Mann-Whitney U-Test

4.4.2 Diskussion

Die direkte und die oxidative DNA-Schädigung waren bei NT-Patienten signifikant gegenüber HD-Patienten und gesunden Probanden erhöht. Dies deutete auf eine weitere Verstärkung des oxidativen Stresses durch die Transplantation hin. Die Unterschiede sind vielleicht zurückzuführen auf die starke Wirkung der Immunsuppressiva und die nicht komplett unterdrückte Abstoßungsreaktion des Immunsystems auf das fremde Organ. Die starken interindividuellen Schwankungen wurden eventuell durch unterschiedliche Immunsuppressiva und die Zeit seit der Transplantation verursacht. Diese Daten standen nicht zur Verfügung.

4.5 Erste Versuche zur Intervention mit einem flavonoid-/polyphenolreichen Mischfruchtsaft

In der Literatur wurde die protektive Wirkung von Gemüse und Obst insbesondere flavonoid-/polyphenolreichen Säften gegen Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs häufig diskutiert (Netzel et al., 2002; Block et al., 1992; Hertog et al., 1993).

In einer Pilotstudie hinsichtlich einer möglichen Intervention zur Reduktion des oxidativen Stresses bei Patienten verzichteten sechs Probanden im Alter zwischen 36 und 62 Jahren in einer zweiwöchigen „Run In“- oder Depletionsphase auf flavonoidreiche, rote Früchte, Obst und Getränke, um dann in der dritten und vierten Woche (Interventionsphase) täglich 350ml Mischfruchtsaft zu trinken. Der Mischfruchtsaft setzte sich aus 30% weißem Trauben-, 25% schwarzem Johannisbeer-, 15% Holunder-, 10% Brombeer-, 10% Sauerkirsch- und 10% Aro-niasaft zusammen (Dietrich, 2000; Netzel et al., 2002). Der hohe Anteil an weißem Traubensaft sorgte für einen guten Geschmack. Der Saft besaß einem Gesamtpolyphenolgehalt von über 2500mg/l (nach Folin, berechnet als Catechin) und eine sehr hohe antioxidative Kapazität. Einmal wöchentlich mittags wurde den Probanden Blut entnommen. Auf potentielle antioxidative Wirkungen wurde anhand der Endpunkte MDA-Bildung im Plasma und DNA-Strangbrüche (Comet Assay) in Leukozyten untersucht. Da bei Probanden mit geringer (oxidativer) DNA-Schädigung eine Erniedrigung mit der Standardmethode nicht zu beobachten gewesen wäre, wurde der Comet Assay variiert: durch Verlängerung der Entwindungs- und Elektrophoresezeit von je 20 auf je 45 Minuten sollte der Test empfindlicher werden.

4.5.1 Malondialdehyd-Bestimmung

Die Veränderung des Plasma-MDA-Gehaltes der sechs Probanden während der Dauer des Interventionsversuches wurde in Abbildung 4.30 dargestellt. Die Werte schwankten über diese vier Wochen hinweg um eine mittlere Konzentration von $1,5\mu\text{M}$ MDA. Es zeigte sich auch bei Betrachtung der Verläufe für die einzelnen Probanden kein einheitlicher Trend.

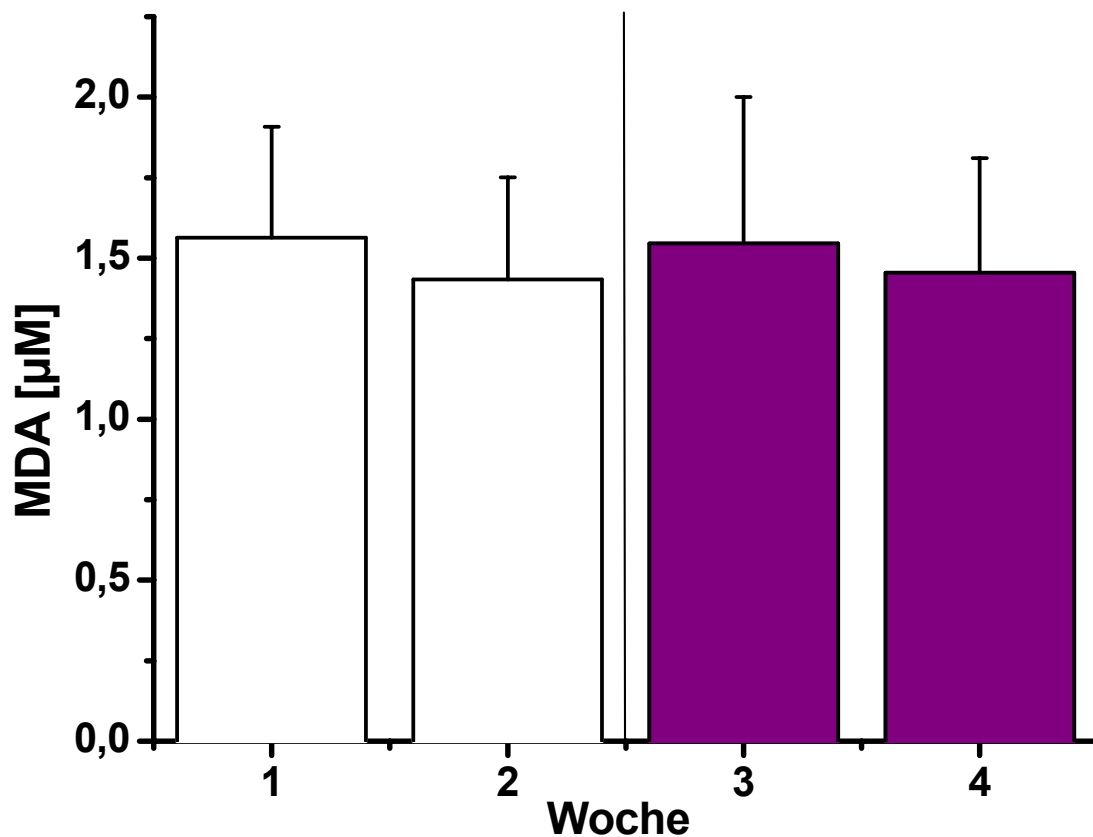


Abbildung 4.30: MDA im Plasma von Probanden (Mittelwerte, $n=6$) in einem Interventionsversuch mit Mischfruchtsaft; Wochen 1 und 2 ohne, Wochen 3 und 4 mit Saft (täglich 350ml)

4.5.2 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

Der (oxidative) DNA-Schaden der sechs Probanden des Interventionsversuchs wurde in Abbildung 4.31 dargestellt. Es wurde eine Tendenz zu geringeren direkten DNA-Schäden beobachtet. Die oxidativen DNA-Schäden stiegen zur zweiten Woche hin leicht an, fielen in der dritten Woche wieder auf das Ausgangsniveau. In der vierten Woche unterschritten die Werte die der ersten Woche.

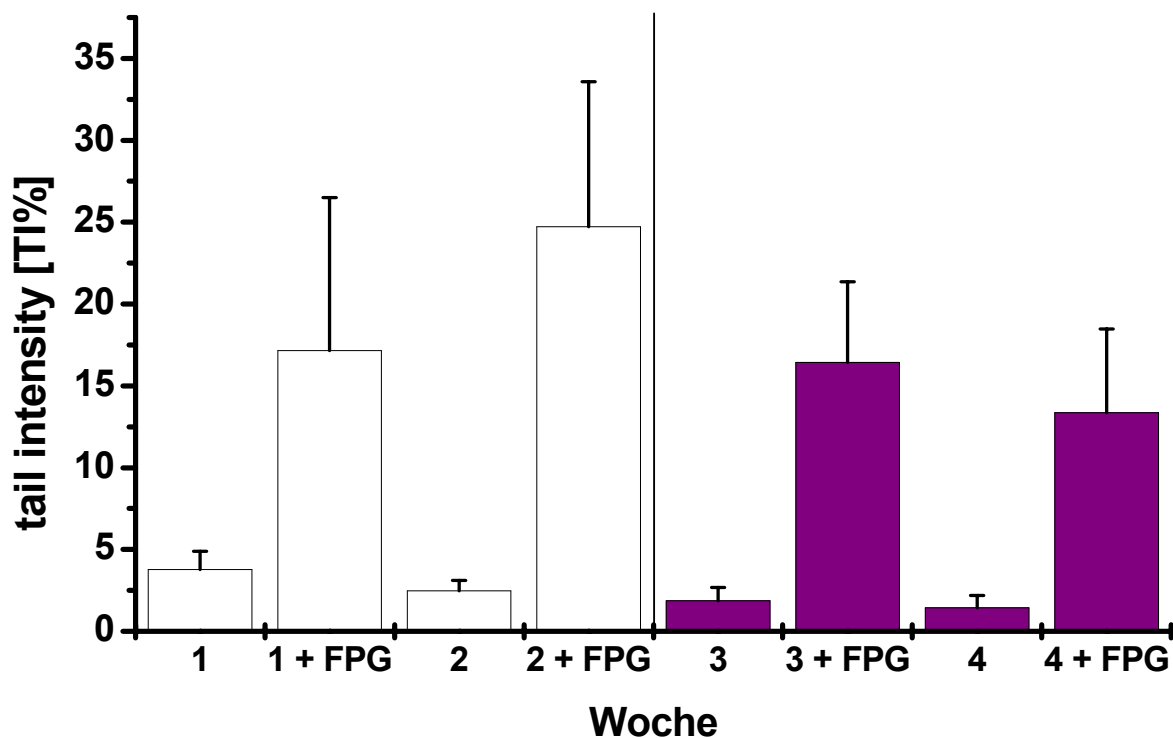


Abbildung 4.31: (Oxidative) DNA-Schäden in Leukozyten von Probanden (Mittelwerte, n=6) in einem Interventionsversuch mit Mischfruchtsaft; Wochen 1 und 2 ohne, Wochen 3 und 4 mit Saft (täglich 350ml)

4.5.3 Diskussion

In dieser Pilotstudie wurde kein Einfluss der Saftintervention auf den Plasma-MDA-Spiegel festgestellt. Netzel et al. (2002) untersuchten sechs Probanden, die eine einzige Portion von 400ml des gleichen Safts tranken. Zwischen zwei und sechs Stunden danach kam es zu einer signifikant erhöhten antioxidativen Kapazität (TEAC) und nach vier Stunden zu einer signifikanten Verringerung des MDA-Gehaltes um 18%. Somit könnte die ausgebliebene Wirkung an der veränderten Interventionsdurchführung liegen, da weniger Saft über einen längeren Zeitraum verzehrt wurde. Eventuell war auch der Mischfruchtsaft schon zu alt und damit in-

aktiv (Dietrich, 2002). Eine geringe Veränderung des MDA-Levels war aufgrund des variierenden Ernährungsstatus nur schwer nachweisbar.

Die Empfindlichkeit des Comet Assay wurde durch die verlängerte Elektrophoresezeit von 20 auf 45 Minuten stark erhöht. Die Schweifintensität der direkten DNA-Schäden stieg von 0,5TI% (s. Kapitel 4.2.1.5) auf etwa 2TI%, die der oxidativen DNA-Schäden von 0,7TI% auf Werte um 17TI%. Der Trend einer Abnahme der oxidativen DNA-Schäden durch die Intervention wies auf eine antioxidative Wirkung des Mischfruchtsaftes hin.

Der Nachweis von oxidierten DNA-Basen in Leukozyten mit dem Comet Assay war in diesem Interventionsschema der geeignetere Marker im Vergleich zur MDA-Bestimmung, da die Leukozyten eine längere Lebenszeit besitzen als Plasmabestandteile und dadurch eine protektive Wirkung des Saftes akkumulieren können.

Eine Intervention mit HD-Patienten sollte neben oxidativer DNA-Schädigung und Plasma-MDA noch weitere Marker einbeziehen, wie die Bestimmung von M₁dG, des Glutathionstatus, der antioxidativen Kapazität oder der Proteinoxidation. Da die HD-Patienten zwischen den Dialysen nicht renal ausscheiden, müssen bei der Festlegung des Interventionsvolumens die absolute Flüssigkeitsmenge und der Kaliumgehalt des Saftes berücksichtigt werden, da beide Faktoren das Herz-Kreislaufsystem stark beeinflussen. Der Glucosegehalt im Saft muss bei Einbeziehung diabetischer Patienten beachtet werden. Die fehlende renale Ausscheidung bringt mit sich, dass schon durch geringe tägliche Saftaufnahmen relativ hohe Plasmaspiegel der Polyphenole und anderer Saftbestandteile erreicht werden und so mit messbaren Wirkungen zu rechnen ist. Eine Flüssigkeitsmenge von 200ml dieses Mischfruchtsaftes täglich sollte aufgrund der Analysendaten von den Patienten gut vertragen werden und ist somit vertretbar (Albert, 2001).

5 Zusammenfassende Diskussion

Die Ergebnisse der Untersuchungen von **Probanden und Patienten vor HD** sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Endpunkte im Blut von Probanden und Patienten vor HD (Mittelwerte); n.s. nicht signifikant

Endpunkt	Probanden	Patienten vor HD	Signifikanz
Harnsäure [μM]	241	314	n.s.
MDA [μM]	1,65	1,56	n.s.
tGSH [μM]	1170	1040	n.s.
GSSG [μM]	36	53	$p < 0,05$
M ₁ dG [10^{-8}dG]	16	22	n.s.
DNA-Schäden [TI%]	0,4	0,6	$p < 0,02$
Ox. DNA-Schäden [TI%]	0,7	5,4	$p < 10^{-6}$

Die Werte der Plasma-Parameter Harnsäure und MDA, sowie der Blutzellmarker tGSH und M₁dG unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Probanden und den Patienten vor HD. Der Gehalt an GSSG war in den Patienten vor HD signifikant erhöht. Die Bestimmung der oxidativen DNA-Schädigung mit dem Comet Assay zeigte die deutlichsten Unterschiede und schien der empfindlichste Marker zu sein. Solch starke Unterschiede zwischen direkter und oxidativer DNA-Schädigung wurden bisher in *in vitro* Untersuchungen mit Zelllinien in der Arbeitsgruppe kaum beobachtet (Glaab et al., 2001; Glaab, 2001; Janzowski et al., 2003). Nur eine einstündige Inkubation von Vollblut unter drastischen Bedingungen mit 100 μM H₂O₂ auf Eis zeigte ähnliche Effekte (0,8 TI% direkte DNA-Schäden, 5,1 TI% oxidative DNA-Schäden, Müller, 2000).

Die eigenen Ergebnisse für oxidative DNA-Schäden bestätigten die von Tarng et al. (2000a) festgestellten Unterschiede im 8-OH-dG-Gehalt, der mit HPLC/ECD bestimmt wurde. Sie fanden in Probanden ungefähr 8 8-OH-dG pro 10^6dG , in Patientenkollektiven 15 bis 25 oxidierte Guaninbasen pro 10^6dG . Eine Abhängigkeit der oxidativen DNA-Schädigung vor HD von der verwendeten Dialysemembran, wie von Tarng et al. (2000a, 2000b) nach Untersuchung von über 50 Patienten je Membran berichtet, wurde mit der eigenen Patientengruppe nicht beobachtet, möglicherweise wegen der zu geringeren Personenzahl.

Die Unterschiede in der Empfindlichkeit der Marker für oxidativen Stress im Plasma und in Leukozyten deuten darauf hin, dass sich der oxidative Stress hauptsächlich auf die Leukozyten beschränkt oder in ihnen entsteht.

Die Eignung des Comet Assay zum Nachweis FPG-sensitiver Stellen in Leukozyten von HD-Patienten wurde erstmals gezeigt. Eine abschließende Bewertung des Immunoslotblot zur Bestimmung von M₁dG als Marker für oxidativen Stress war aufgrund der noch geringen Datenmenge schwierig.

Die zeitliche Verfolgung der untersuchten Marker **während der HD** (Skizze s. Abbildung 5.1) zeigte eine starke Elimination der Harnsäure, signifikante Verringerungen der tGSH- und GSSG-Gehalte und nahezu konstante Level der (oxidativen) DNA-Schädigungen.

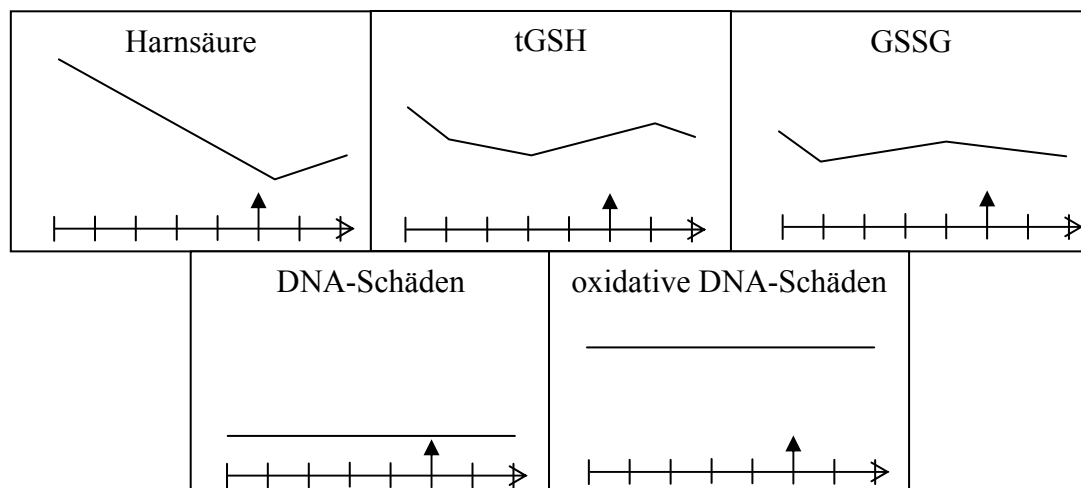


Abbildung 5.1: Skizzierte Veränderungen der untersuchten Marker während der HD. Die Striche stellen Zeitpunkte der Blutentnahmen dar, der Pfeil zeigt das Ende der HD an.

Da sich das Ausmaß der oxidativen DNA-Schädigung am Ende der HD nicht von den Anfangswerten unterschied, schien der oxidative Stress über die ganze Zeit zwischen den Dialysesetagen vorhanden. Die DNA-Reparatur war zu gering, um die Schädigung (FPG-sensitive Stellen) komplett zu beseitigen. Auch wurde der oxidative Stress im Plasma und in den Blutzellen nicht durch eine starke Reduktion der Harnsäure weiter verstärkt. Die Harnsäure spielt also als Antioxidanz im Blut von HD-Patienten nur eine untergeordnete Rolle.

Der **Membranvergleich** ergab nahezu identische Plasma-MDA-Gehalte für alle getesteten Dialysatoren und schwach, aber signifikant erhöhte oxidative DNA-Schäden bei HD mit der halbsynthetischen Baxter DICEA 170. Die interindividuellen Schwankungen waren im Comet Assay geringer als bei der MDA-Bestimmung. Dies könnte durch eine Abhängigkeit des Plasma-MDA-Gehaltes vom momentanen Ernährungszustand des Patienten und damit vom

Lipidgehalt des Plasmas erklärt werden. Die oxidative DNA-Schädigung hängt vermutlich hauptsächlich vom Gleichgewicht zwischen der Generierung von ROS und der DNA-Reparatureffizienz ab und stellt somit einen langfristigeren Parameter dar.

Die Untersuchung von oxidativen DNA-Schäden mit dem Comet Assay war ein geeigneter Marker, um membraninduzierten oxidativen Stress nachzuweisen und bestätigte die Ergebnisse, die Tarng et al. (2000a/b) bei einem Membranvergleich mit dem Marker 8-OH-dG erhielten. Mit der MDA-Bestimmung wurde in diesen Untersuchungen keine Modulation des oxidativen Stresses nachgewiesen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die ROS-Bildung im Plasma nicht besonders ausgeprägt war, sondern hauptsächlich leukozytenassoziiert war (vgl. Patienten vor HD).

Im Unterschied dazu induzierte eine **Eisen-Infusion** eine starke MDA-Bildung und eine verzögert auftretende oxidative DNA-Schädigung, deren Ausmaß größer war als der mittlere Unterschied zwischen den Dialysemembranen.

Die Untersuchung der Eisen-Infusion und die Cross Over Studie deuten auf unterschiedliche Ursachen für den oxidativen Stress hin: die Eisen-Infusion ins Plasma kann über die Fentonreaktion (s. Kapitel 2.1) zuerst LPO und anschließend DNA-Oxidation induzieren. Bei den Membranen hingegen erkennt man einen deutlichen, materialabhängigen Unterschied in der DNA-Oxidation und nahezu identische MDA-Werte, woraus sich auf eine Induktion des oxidativen Stresses durch die Leukozyten schließen lässt. Diese ROS-Produktion könnte auf einer Immunantwort der weißen Blutzellen auf eine Stimulation sowohl durch die nicht biogenen Oberflächen als auch durch Stoffwechselprodukte wie AGEs beruhen, die während der HD nicht ausgeschieden werden (Hörl, 1998).

Das Membranmaterial trägt also wie die Eisenbehandlung zum oxidativen Stress bei (Canaud et al., 1999; Handelman, 2000), wobei der langfristige Einfluss des einmal wöchentlich applizierten Eisen-Präparats und der dreimal wöchentlich durchgeführten HD auf die Folgeerkrankungen nur schwer abzuschätzen ist.

Die spezielle modifizierte MARS-Membran löste bei der Behandlung von **Patienten mit akutem Leberversagen** keine zusätzlichen DNA-Schäden aus. Es kam aber andererseits auch nicht zu einer deutlichen Reduktion der bestehenden DNA-Schäden, obwohl sich die starke Entgiftung des Körpers nicht nur auf klinische Marker günstig auswirken sollte. Der Vergleich der aufeinander folgenden Behandlungstage zeigte ebenfalls keine Verringerung der Schäden, was auf weiter bestehende akute Erkrankungen hinweist, aufgrund derer die DNA-Schäden in den Leukozyten nicht beseitigt werden konnten. Das Ausmaß der (oxidativen)

DNA-Schäden der MARS-Patienten war mit dem der urämischen Patienten vergleichbar und deutlich erhöht gegenüber Patienten mit alkoholbedingter Hepatopathie.

Die **Nierenersatztherapie Transplantation** induzierte stärkere oxidative DNA-Schäden als die HD. Somit könnten sowohl Immunantworten auf das körperfremde Organ als auch die medikamentöse Behandlung einen größeren Einfluss auf den oxidativen Stress haben als die Urämie mit Anreicherung von AGEs, die HD-Membran oder die Eisenbehandlung.

Die Intervention mit dem **flavonoid-/polyphenolreichen Mischfruchtsaft** ergab bei sechs Probanden keine messbare Beeinflussung des Plasma-MDA-Gehaltes. Netzel et al. (2002) zeigten an Probanden eine Reduktion der MDA-Bildung in einem kürzeren Zeitraum nach der Einnahme. So könnte sich der Saft bei HD-Patienten, kurz vor der Eisen-Infusion eingenommen, günstig auf den Plasma-MDA-Spiegel auswirken. Die bei der Intervention gefundene leichte Verringerung der oxidativen DNA-Schäden deutet auf einen protektiven Effekt der Flavonoide/Polyphenole auf die Leukozyten hin, der vielleicht zur Verringerung des oxidativen Stresses in HD-Patienten ausgenutzt werden könnte. Nach den eigenen Ergebnissen würde die langfristige Einnahme eventuell positive Einflüsse auf das Ausmaß der oxidativen DNA-Schädigung ausüben.

6 Zusammenfassung

Der oxidative Stress wurde in Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen/Therapien, bei denen ein erhöhter oxidativer Stress aus der Literatur zum Teil bereits bekannt ist, nachgewiesen. Patienten mit chronischem Nierenversagen, die mit der Nierenersatztherapie Hämodialyse (HD) behandelt wurden, wurden sowohl vor als auch während der Behandlung untersucht und mit gesunden Probanden verglichen:

Hierzu wurden die Konzentrationen von Harnsäure (photometrisch) und MDA im Plasma (HPLC/Fluoreszenz, Thiobarbitursäurederivat), sowie das Ausmaß des MDA-dG-Adduktes M₁dG (Immunoslotblot) und (oxidativer) DNA-Schäden mit dem Comet Assay in Leukozyten untersucht. Der Gehalt an Glutathion wurde im Vollblut mit einem kinetischen, photometrischen Test bestimmt. Der Einfluss verschiedener Dialysemembranen und der Anämiebehandlung mit einem Eisen-Präparat auf den oxidativen Stress wurde mit den Markern oxidative DNA-Schädigung und MDA-Bildung im Plasma geprüft. Ein Faktor für die Biokompatibilität der speziell modifizierten MARS-Membran zur Therapie von Patienten mit akutem Leberversagen wurde mit der herkömmlicher Dialysemembranen mit Hilfe des Comet Assay verglichen. Das Ausmaß (oxidativer) DNA-Schäden durch das Nierenersatzverfahren Transplantation wurde dem der HD gegenübergestellt. In einer Pilotstudie wurde die antioxidative Wirksamkeit eines Mischfruchtsaftes an gesunden Probanden anhand der Endpunkte DNA-Schädigung und MDA-Bildung geprüft.

Vor HD zeigte sich im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ein starker oxidativer Stress in den Blutzellen, hauptsächlich auf DNA-Ebene. **Während der HD** wurde in den Blutzellen eine Belastung der antioxidativen Abwehr beobachtet, die sich aber weder auf DNA-Ebene noch in einer verstärkten LPO im Plasma äußerte. Die starke Elimination der Harnsäure wirkte sich ebenfalls nicht auf die anderen Marker im Plasma oder den Blutzellen aus. Somit hatte der Verlust der Harnsäure im Plasma keinen messbaren oxidativen Effekt. Die Untersuchung der oxidativen DNA-Schäden mit dem Comet Assay war der empfindlichste Marker zum Nachweis des oxidativen Stress.

Die Untersuchung des **Einflusses der Dialysemembran** zeigte eine geringere Induktion von oxidativem Stress und damit eine höhere Biokompatibilität der synthetischen Polysulfonmembran (Fresenius F8) und der halbsynthetischen, Vitamin E-beschichteten Cellulosemembran (Terumo E15) im Vergleich zur halbsynthetischen, diacetylierten Cellulosemembran (Baxter DICEA170). Die **Infusion eines Eisen-Präparates** beeinflusste das Ausmaß der Plasma-MDA-Bildung und der oxidativen DNA-Schädigung stärker als die HD-Membran.

Der oxidative Stress wurde bei diesen dialyseassoziierten Einflussfaktoren über unterschiedliche Wege ausgelöst: Die Eisen-Infusion kann über die Fentonreaktion die Generierung von ROS induzieren, die dann weitere Zellbestandteile – zuerst im Plasma, dann in den Leukozyten – schädigen. Die Dialysemembranen stimulieren die Leukozyten in unterschiedlichem Maße zur ROS-Produktion, die sich hauptsächlich auf Ebene der DNA auswirkt. Diese Ergebnisse bestätigten sowohl den in der Literatur beschriebenen erhöhten oxidativen Stress in HD-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden, als auch die modulierenden Eigenschaften der Dialysemembran und der Anämiebehandlung. Um die langfristige Konsequenz dieser dialysebedingten Einflüsse für die Folgeerkrankungen besser verstehen zu können, sollten sie in prospektiven Studien weiter untersucht und mit der Morbidität für Atherosklerose und Krebs korreliert werden.

Die Membran der **MARS-Therapie** löste keine zusätzlichen oxidativen DNA-Schäden aus. Hier könnte der Comet Assay klinische prognostische/diagnostische Parameter ergänzen, was in weiteren Untersuchungen noch abgeklärt werden muss.

Die **Nierentransplantation** verstärkte den oxidativen Stress im Vergleich zur Ersatztherapie HD.

Die ersten Ergebnisse zeigten nach Intervention mit dem **Mischfruchtsaft** leicht verringerte oxidative DNA-Schäden. Diese Wirkung sollte an einem größeren Kollektiv mit verschiedenen Dosierungen überprüft werden.

Zusammenfassend sind HD-Patienten eine Population, deren erhöhter oxidativer Stress mit unterschiedlichen Markern verfolgt werden kann. Erstmals wurde die besondere Eignung des Comet Assays zur Erfassung oxidativer DNA-Schäden in HD-Patienten nachgewiesen. Zwei Arten von oxidativen Ereignissen scheinen bei diesen Patienten eine Rolle zu spielen: ein latenter dialysemembranabhängiger, leukozytenvermittelter oxidativer Stress und eine aus den Eiseninfusionen resultierende Überlastung der antioxidativen Abwehr.

7 Material und Methoden

7.1 Allgemeines, Geräte, Materialien und Lösungen

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure [Sigma-Aldrich]

5-Sulfosalicylsäure [Sigma-Aldrich]

Ammoniumacetat [Roth]

Antikörper Ziege Anti-Maus-Immunoglobulin HRP conjugated [DakoCytomation, Hamburg]

Antikörper Maus Anti-M₁dG D10A1H9 [L. Marnett, Nashville, Tennessee, USA]

Bernsteinsäure Natriumsalz [Fluka]

Butanol [Merck]

Calciumchlorid [Fluka]

Calf Spleen Phosphodiesterase [Sigma-Aldrich]

Calf Thymus DNA [Sigma-Aldrich]

Desoxyadenosin [Sigma-Aldrich]

Desoxycytosin [Sigma-Aldrich]

Desoxyguanosin [Sigma-Aldrich]

Dimethylsulfoxid für UV-Spektroskopie (DMSO) [Fluka]

Dinatriumhydrogenphosphat p.A. [Merck]

EDTA p.A. [Severa]

Ethanol [Roth]

Ethidiumbromid [Sigma-Aldrich]

Glutathion, oxidiert [Acros]

Glutathion, reduziert [Sigma-Aldrich]

Glutathion-Reduktase [Sigma-Aldrich]

Harnsäure-Bestimmungs-Kit [Sigma Diagnostics]

HEPES (4-[(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure) [Roth]

Histopaque 1077 [Sigma-Aldrich]

Kaliumchlorid p.A. [Merck]

Kaliumhydrogenphosphat p.A. [Merck]

Low Melting Point Agarose [Biomme]

LumiGlo [New England Biolabs]

M₁dG [L. Marnett, Nashville, Tennessee, USA]

Malondialdehyd-Bestimmungs-Kit [Best.-Nr. 1203.001, Sobioda, Frankreich]

Methanol [Roth]
Methanol zur HPLC [Merck]
Micrococcal Nuklease [Sigma-Aldrich]
Milchpulver [Glücksklee (Nestle), Roth]
NADPH [Sigma-Aldrich]
Natriumchlorid p.A. [Roth]
Natriumhydroxid p.A. (NaOH) [Riedel de Haen]
N-Laurylsarcosin [Sigma-Aldrich]
Normal Melting Point Agarose [Roth]
Nuklease P₁ [Sigma-Aldrich]
Propidiumiodid [Sigma-Aldrich]
QIAamp[®] DNA Blood Midi Kit [Qiagen]
Salzsäure [Roth]
SuperSignal Extended Duration [Pierce]
t-Butylhydroxytoluol [Sigma-Aldrich]
Tetramethoxypropan [Sigma-Aldrich]
Thymidin [Sigma-Aldrich]
Triethanolamin [Sigma-Aldrich]
Triethylammoniumacetat Puffer 1M [Fluka]
Tris [Roth]
Triton X-100 [Sigma-Aldrich]
Trypanblau [Sigma-Aldrich]
Trypsin [Severa]
Tween 20 [Sigma-Aldrich]
Vinylpyridin [Sigma-Aldrich]
Wasserstoffperoxid 30% [Riedel de Haen]

Geräte

Auflichtmikroskop [Zeiss]
Wasserbad [Julabo]
Zentrifuge Minifuge [Heraeus]
Varioklav Dampfsterilisator [H+P]
Trockenschrank U40 [Mettler]

Digitalwaage [Sartorius]

Neubauerzählkammer

Kolbenhubpipetten [Eppendorf, Gilson]

Multipette [Eppendorf]

Biofreezer Herafreeze [Heraeus]

Gene Quant II [Pharmacia, Freiburg]

Zeiss Axioskop 20, Filter Set 15 [Anregung: BP 546/12; Emission: LP 590]

Comet II [Perceptive Instruments, Suffolk, England]

Wasserbad [Julabo]

Elektrophoresekammer für horizontale Gelelektrophorese [Sub Cell GT Biorad]

HPLC-Anlage [Jasco], bestehend aus PU 1580, DG 1580-53, LG 1580-02, FP 1520, UV 1575, AS 1550

Thermomixer Comfort [Eppendorf]

Minifold II [Schleicher & Schuell]

Lumi-Imager [Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics]

Verbrauchsmaterialien

EDTA-Monovetten und Kanülen steril [Sarstedt]

Objektträger einseitig ganz mattiert 26 x 76 x 1,0 mm [Menzel, Braunschweig]

Deckgläser 24 x 24 mm [Menzel, Braunschweig]

LichroSpher 100 (5µm) RP-18 250mm x 4mm [Merck]

PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml steril [Greiner]

Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml [Greiner]

Nytran 0,2µM [Schleicher & Schuell]

Protran BA79 0,1µM [Schleicher & Schuell]

Gel-Blotting-Paper GB 002 [Schleicher & Schuell]

Blutentnahmen

Das Blut von Probanden und Patienten wurde mit EDTA-Monovetten entnommen.

Statistische Betrachtungen

Untersuchungen auf signifikante Unterschiede wurden durchgeführt mit dem Wilcoxon-(Rangsummen)-Test bei gepaarten bzw. abhängigen Ergebnissen und mit dem Mann-Whitney U-Test bei unabhängigen, nicht-normalverteilten Ergebnissen.

7.2 Harnsäure-Bestimmung

Die Harnsäure wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit der Firma Sigma Diagnostics (Uric Acid, Procedure No. 686) nach den Angaben des Hersteller bestimmt. Das hierfür eingesetzte Plasma wurde durch Zentrifugation (5min, 2000rpm) von EDTA-Blut gewonnen.

7.3 Glutathion-Bestimmung

Puffer A:

1,7g KH_2PO_4
+ 234mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$
auf 100ml bidest. Wasser auffüllen
(Lagerung bei 0-4°C, nicht länger als 2 Wochen)

Puffer B:

2,175g K_2HPO_4
+ 0,234g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$
auf 100ml bidest. Wasser auffüllen
(Lagerung bei 0-4°C, nicht länger als 2 Wochen)

Puffer A+B:

15ml Puffer A + 85ml Puffer B ergibt pH 7,5 (frisch herstellen)

20mM NADPH in 0,5%iger NaHCO_3 -Lösung:

18mg NADPH + 1ml 0,5%ige NaHCO_3

0,5%ige NaHCO_3 :

50mg NaHCO_3 -Lösung auf 100ml bidest. Wasser;

in dunkler Flasche bei 0-4°C aufbewahren

6mM DTNB:

24mg DTNB in 10ml Puffer (A+B) lösen

im Dunkeln bis zum Gebrauch aufbewahren

Glutathionreduktase-Lösung:

0,5U GSR/10 μ l Phosphatpuffer ansetzen

5-SSA:

10%ig: 100g 5-SSA in 1000ml bidest. Wasser

5%ig: 50g 5-SSA in 1000ml bidest. Wasser

Triethanolamin-Lösung:

1:1 verdünnen in bidest. Wasser

Vinylpyridin

Die Methode nach Gallagher et al. (1994) ermöglichte die Bestimmung von tGSH und GSSG und somit auch die anschließende Berechnung des GSH-Status.

Küvettenmix: Jede Küvette enthielt je 10 μ l NADPH-Lösung, 100 μ l DTNB-Lösung und 700 μ l Puffer A+B. Diese Reagenzien wurden vor der Messung miteinander gemischt und in einer dunklen Flasche auf Eis bis zum Gebrauch aufbewahrt. Pro Küvette waren des Weiteren 150 μ l Aqua_{bidest} bei der tGSH-Messung und 70 μ l bei der GSSG-Messung hinzuzufügen, um bei den Messungen ein einheitliches Volumen von 1ml zu gewährleisten.

GSH-Standards: Es wurden Standards der Konzentrationen 32 μ M, 16 μ M, 8 μ M, 4 μ M, 2 μ M, 1 μ M und 0 μ M hergestellt. Jeweils 20 μ l wurden daraus für die Messung zum Küvettenmix gegeben und die Extinktion bei 412nm zum Zeitpunkt t=0min gemessen. Die kinetische Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l GSR gestartet: der Ansatz wurde einige Sekunden gemischt und die Extinktion nochmals nach genau 10min gemessen. Die erhaltenen Extinktionsdifferenzen sind direkt proportional zur tGSH-Konzentration in der Probe.

GSSG-Standards: Es wurden Standards der Konzentrationen 32 μ M, 16 μ M, 8 μ M, 4 μ M, 2 μ M, 1 μ M und 0 μ M hergestellt. Von diesen Lösungen wurden jeweils 250 μ l mit 60 μ l Triethanolamin und 10 μ l 2-Vinylpyridin versetzt, gemischt und eine Stunde bei 26°C im Thermomixer derivatisiert. Jeweils 100 μ l wurden dann zum Küvettenmix pipettiert, die anschließende Messung ist der der GSH-Standards analog.

Vollblutproben: Zu 1,2ml 10%iger 5-SSA wurden direkt nach der Entnahme 0,3ml EDTA-Blut gegeben (Verdünnung 1:5), in flüssigem Stickstoff bei -180°C eingefroren und bis zur Messung aufbewahrt.

Nach dem Auftauen wurden die Proben bei 13000rpm, 4min und 4°C abzentrifugiert, der Überstand zur tGSH- (Verdünnung 1:10 mit 5%iger 5-SSA, Endverdünnung 1:50) und GSSG-Messung (Verdünnung 1:5 mit 5%iger 5-SSA, Endverdünnung 1:25) analog den Standards eingesetzt.

7.4 Malondialdehyd-Bestimmung

Der MDA-Gehalt in Plasmaproben wurde mit den Komponenten eines kommerziell erhältlichen Kits der Firma Sobioda in veränderter Durchführung bestimmt. Zwei Teile der TBA-Lösung wurden zu einem Teil Perchlorsäurelösung gegeben und davon 80 μ l zu 10 μ l Plasma oder Standard in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Das Blutplasma wurde durch Zentrifugation von 1ml Blut bei 2000rpm gewonnen und mit 0,05% t-Butylhydroxytoluol (BHT) in Ethanol bis zur Messung eingefroren. Der Ansatz wurde nach dem Vortexen 1h auf 95°C erhitzt, anschließend 5min auf Eis gekühlt und zentrifugiert (2min, 6000rpm). Nach Zugabe von 200 μ l Butanol wurde 1min gevortext und 5min bei 6000rpm zentrifugiert. Aus der Butanolphase wurden 150 μ l entnommen und in ein HPLC-Vial mit 300 μ l Einsatz gegeben und vermessen. Die Identifikation erfolgte über die Retentionszeit, die Quantifizierung durch Vergleich der Peakflächen mit denen externer Standards. Es wurden Doppelbestimmungen mit maximal neun Proben durchgeführt, die direkt vermessen wurden, um eine ausreichende Stabilität des Derivats zu gewährleisten.

Einstellungen HPLC:

Säule: LichroSpher 100 (5 μ m) RP-18 250mm x 4mm [Merck]

Fließmittel 57% Phosphat-Puffer (12,5mM Na₂HPO₄, pH 7,4) mit 43% Methanol, Flow: 1ml/min

Injektionsvolumen: 20 μ l

Fluoreszenzdetektor: Extinktion: 532nm, Emission: 553nm

Laufdauer: 5 min, MDA-Peak: 3,2min

7.5 Herstellung einer M₁dG-Standard-DNA und Quantifizierung per HPLC

0,1M KH₂PO₄, pH 4,5

10mM K₂HPO₄, pH 6,9

1M HCl

KOH

Ethanol

SSCC-Puffer: 10mM Bernsteinsäure Natriumsalz, 5 mM Calciumchlorid, pH 6

Micrococcal Nuklease: 50U, 0,78mg auf 31µl SSCC-Puffer

Spleen phosphodiesterase (SPDE)

Nuklease P₁: 310U, 1mg auf 62µl SSCC-Puffer

0,1M Triethylammoniumacetat (TEA), pH 5

Methanol

M₁dG, dA, dC, dG, dT

Zur MDA-Herstellung wurden 25mmol Tetramethoxypropan (TMP, 4,09ml) in 25ml 1M HCl bei 40°C 40min hydrolysiert. Diese Lösung wurde mit KOH-Plättchen auf pH 4,5 eingestellt. 0,52ml einer CT-DNA-Lösung (0,5mg/ml in 0,1M KH₂PO₄) wurden vier Tage bei 37°C mit 25µl der MDA-Lösung (≈ 20mM) und 455µl 0,1M KH₂PO₄ geschüttelt. 0,5ml wurden zur DNA-Fällung wurde mit 1ml Ethanol (-70°C) versetzt, 40 min behandelt und anschließend 45min bei 13000rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets wieder mit 1ml 70% Ethanol (-20°C) gewaschen erneut 20min abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets getrocknet, in je 0,2ml 10mM K₂HPO₄ aufgenommen, vereinigt und der DNA-Gehalt bestimmt.

Zum Verdau der DNA zu Desoxynukleotiden wurden 0,5µg DNA mit 1µl MN (1,6U) und 0,5µl SPDE (24mU) zusammengegeben und mit SSCC-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 24µl gebracht. Nach 2h bei 37°C wurden 1µl Nuklease P₁ (5U) hinzugefügt und über Nacht inkubiert.

Die Konzentrationen an M₁dG, dC, dG, dT und dA wurden mittels HPLC quantifiziert.

HPLC-Bedingungen:

UV-Detektor (Bestimmung von dC, dG, dT und dA): 260nm

Fluoreszenzdetektor (Bestimmung von M₁dG): Extinktion: 360nm, Emission: 490nm

Gradient: 0-8min: TEA/Methanol: 90/10

8-9min: TEA/Methanol: 80/20

9-20min: TEA/Methanol: 90/10

Flow: 0,7ml/min

Retentionszeiten:

dC: 4min

dG: 7,6min

dT: 8,8min

dA: 14,3min

M₁dG: 16,6min

7.6 M₁dG-Bestimmung

10mM K₂HPO₄ (pH 6,9)

2M NH₄(CH₃COO)

1M NH₄(CH₃COO)

PBS: 5 g NaCl

+ 0,25 g KCl

+ 0,72 g Na₂HPO₄

+ 0,125 g KH₂PO₄

auf 500ml mit bidest. Wasser auffüllen; pH-Wert 7,3-7,4; vor Gebrauch autoklavieren

PBS-T: PBS mit 0,1% Tween 20

PBS-T mit 5% Milchpulver

PBS-T mit 0,5% Milchpulver

100µg/ml CT-DNA

100µg/ml MDA-behandelte CT-DNA mit 10fmol M₁dG pro µg DNA

Antikörper Ziege Anti-Maus-Immunoglobulin HRP conjugated

M₁dG-Standard-Reihe:

Es wurden neun 50µl Standards mit 5µg DNA und verschiedenen M₁dG-Gehalten hergestellt (s. Tabelle 7.1).

Tabelle 7.1: Pipettierschema zur Herstellung der im Immunoslotblot eingesetzten Standards

	CT-DNA (100µg/ml)	MDA-behandelte CT-DNA (100µg/ml)	M ₁ dG (fmol/µg)
1	50µl	0µl	0
2	48µl	2µl	0,4
3	45µl	5µl	1
4	40µl	10µl	2
5	35µl	15µl	3
6	25µl	25µl	5
7	20µl	30µl	6
8	10µl	40µl	8
9	0µl	50µl	10

Die Standards wurden gevortext, zentrifugiert (14000rpm, 1min) und 35µl (3,5µg DNA) in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Nachdem 65µl 10mM K₂HPO₄ (pH 6,9) hinzugegeben wurden, wurde erneut gevortext und zentrifugiert (14000rpm, 1min). Nach 20min Ultraschallbadbehandlung wurden 150µl PBS zupipettiert, gevortext und 5min auf 99°C erhitzt, anschließend für mindestens 10min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation (14000rpm, 2min) wurden 250µl 2M NH₄(CH₃COO) hinzugefügt, gevortext, zentrifugiert (14000rpm, 1min) und 142,9µl (1µg) auf den Nitrocellulosefilter pipettiert.

Proben: Aus Blutproben wurde die DNA mit dem Qiagen QIAamp[®] DNA Blood Midi Kit isoliert und in H₂O_{bide} aufgenommen, der DNA-Gehalt mit einem GeneQuant bestimmt und bei -70°C aufbewahrt. Ein Volumen mit 3,5µg DNA wurde mit 10mM K₂HPO₄ pH 7,0 auf 100µl aufgefüllt und anschließend wie bei den Standards verfahren.

Immunoslotblot: Zwei Gel Blotting Paper wurden in 1M NH₄(CH₃COO) getränkt und auf die Minifold-Immunoslotblot-Apparatur gelegt. Der Nitrocellulose-Filter wurde zuerst in H₂O_{bide}, dann in 1M NH₄(CH₃COO) getränkt und anschließend blasenfrei auf die Gel Blotting Paper gelegt. Die Apparatur wurde zusammengebaut und an eine laufende Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Es wurden nun 1µg DNA in jeden Slot pipettiert. Jeder Standard und jede Probe wurden dreifach bestimmt. Nachdem der Filter trocken gelaufen war, wurde jeder

Slot mit 200µl 1M $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})$ gewaschen. Nach Durchsaugen der gesamten Flüssigkeit wurde das Vakuum noch für 20min aufrecht erhalten. Der Filter wurde mit einem Kugelschreiber markiert, bei 80°C 1,5h getrocknet und anschließend eine Stunde mit 100ml PBS-T mit 5% Milchpulver geblockt.

Der Filter wurde zweimal 5min mit PBS-T gewaschen und in einem Plastikbeutel mit dem Primärantikörper (D10A1H9, Verdünnung: 38800fach in 40ml PBS-T mit 0,5% Milchpulver) zwei Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS-T wurde mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung: 4000fach, 8µl in 32ml PBS-T) wiederum für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran einmal 15min und zweimal 5min mit PBS-T gewaschen. Nach Inkubation mit dem Chemolumineszenz-Reagenz (LumiGlo, SuperSignal, 1-19min Expositionszeit) wurde die Enzymreaktion am Antikörper mit einem Lumi-Imager detektiert. Die DNA-Detektion erfolgte nach drei Stunden Propidium-Iodid-Färbung und 30min Entfärbung bei 600nm Emission und 100ms Expositionszeit.

Die Bilder der M₁dG- und DNA-Detektion wurden mit der entsprechenden Software ausgewertet. Die gemessenen M₁dG-Intensitäten wurden für jeden Standard/Probe auf die jeweilige DNA-Intensität bezogen.

Vergleiche der Standardreihe aus der eigenen Derivatisierung mit von R. Singh zur Verfügung gestellten Standards, zeigten zu hohe Intensitäten der eigenen M₁dG-Standards. Nach mehreren Bestimmungen wurden sie um Faktor 2,86 korrigiert.

7.7 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

PBS: 8,0g NaCl
 0,2g KCl
 0,2g KH_2PO_4
 1,15g Na_2HPO_4

mit bidest. Wasser auf 1l auffüllen und mit 1N NaOH auf pH 7,4 einstellen

NMA: 0,5% in PBS

LMA: 0,7% in PBS

Lyse-Stammlösung: 146,1g NaCl
37,2g EDTA
1,2g Tris

in 1l bidest. Wasser lösen und mit NaOH (ca. 8g) auf pH 10 einstellen

10g N-Laurylsarcosin Na-Salz

Lyse-Gebrauchslösung: 89% Lyse-Stammlösung
1% Triton X-100
10% DMSO

Elektrophoresepuffer: 200g NaOH in 500ml bidest. Wasser
(Stammlösungen) 14,9g EDTA in 200 ml bidest. Wasser

Gebrauchslösung: 30ml NaOH-Lösung
5ml EDTA-Lösung
auf 1l mit bidest. Wasser auffüllen

Neutralisationspuffer: 48,5g Tris
auf 1l mit bidest. Wasser auffüllen und mit HCl auf pH 7,5 einstellen

Ethidiumbromid Lösung:

(Stammlösung) 10mg in 50ml bidest. H₂O

(Gebrauchslösung) 100µl Stammlösung + 900µl bidest. H₂O

40µl Normal Melting Agarose (NMA) wurden auf einen Objektträger gegeben und mit der kurzen Kante eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Nachdem die Agarose auf dem Objektträger getrocknet war, wurde anschließend zweimal nebeneinander je 65µl NMA aufgetragen und sofort mit einem Deckglas (24 x 24mm) zugedeckt. Die so vorbereiteten Objektträger wurden im Kühlschrank bei 4°C in einer feuchten Box bis zum Gebrauch aufbewahrt.

6µl der Blutprobe wurden in 1,5ml Reaktionsgefäße pipettiert, mit 65µl Low Melting Agarose (LMA) aufgenommen und auf einen vorbereiteten Objektträger verteilt, bei dem zuvor das Deckglas entfernt wurde. Die Agarose wurde mit einem Deckglas zugedeckt und auf Eis erkalten gelassen.

Nach Entfernen der Deckgläser wurden die Objektträger in eine mit eiskaltem Lysepuffer gefüllte Färbekammer gestellt. Die Lysezeit betrug mindestens eine Stunde bei 4°C.

Anschließend wurden die Objektträger in einer Färbekammer dreimal 5min mit je 100ml eiskaltem Enzympuffer gewaschen und leicht trocknen gelassen. 50µl Enzymlösung bzw. 50µl Enzympuffer wurden auf das Gel gegeben, dieses mit einem Deckglas zugedeckt und für 30 Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt.

Nach dem Entfernen der Deckgläser wurden die Objektträger in eine eisgekühlte Elektrophoresekammer gelegt, die Kammer mit eiskaltem Elektrophoresepuffer befüllt, so dass die Gele etwa 0,5cm hoch überdeckt waren. Nach 20 Minuten wurde die Spannung eingestellt (25V; 0,89V/cm) und durch Zugabe oder Entnahme von Puffer die Stromstärke auf 300mA reguliert. Die Dauer der Elektrophorese betrug 20 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger wiederum in eine Färbekammer gestellt, dreimal 5min mit je 100ml eiskaltem Neutralisationspuffer gewaschen, mit 40µl Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Deckglas bedeckt. Bis zur Auswertung wurden sie in einer feuchten dunklen Box im Kühlschrank aufbewahrt.

Pro Deckglas wurden 50 Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dabei wurde das Deckglas mäanderförmig abgesucht und alle einzelnen, sich nicht überdeckenden Zellen gemessen. Die Quantifizierung erfolgte über die Tail Intensity (% der DNA im Schweif). Bei den direkten DNA-Schäden wurden zwei Deckgläser, bei den FPG-behandelten 4 Deckgläser untersucht. Die 50 Zellen pro Deckglas wurden gemittelt und anschließend die Mittelwerte gemittelt.

8 Literatur

Akerboom T. P. M., Sies H. (1981): Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology* 77: 373-382

Albert F. W. (2001): Med. Klinik III, Westfalz-Klinikum Kaiserslautern, persönliche Mitteilung

Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group (1994): The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *The New England Journal of Medicine* 330 (15): 1029-1035

Bayés, B., Pastor, M. C., Bonal J., Junca, J., Romero, R. (2001): Homocysteine and lipid peroxidation in haemodialysis: role of folic acid and vitamin E. *Nephrology Dialysis Transplantation* 16: 2172-2175

Becker B. F. (1993): Towards the physiological function of uric acid. *Free Radical Biology & Medicine* 14: 615-631

Beckman K. B., Ames B. N. (1998): The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews* 78 (2): 547-81

Belitz H.-D., Grosch W. (1992): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4.Auflage, Springer-Verlag

Benamira M., Johnson K., Chaudhary A., Bruner K., Tibbetts C., Marnett L. J. (1995): Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: Determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* 16 (1): 93-99

Biernacki M., Bigda J., Jankowski K., Woznak M., Sledzinski Z. (2002): Increased serum levels of markers of oxidative stress during kidney transplantation. *Transplantation proceedings* 34: 544-545

Block G., Patterson B., Subar A. (1992): Fruit and vegetable and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 18: 12-29

Boaz M., Green M., Fainauru M., Smetana S. (2001): Oxidative stress and cardiovascular disease in hemodialysis. *Clinical Nephrology* 55(2): 93-100

Bowry S. K. (2002): Dialysis membranes today. *International Journal of Artificial Organs* 25 (5): 447-460

Buoncrisiani U., Galli F., Rovinati S., Alberatine M. C., Campus G., Canestrai F. (1997): Oxidative damage during hemodialysis using a vitamin-E-modified dialysis membrane: a preliminary characterization. *Nephron* 77: 57-61

Canaud B., Cristol J.-P., Morena M., Leray-Moragues H., Bosc J.-Y., Vaussenat F. (1999): Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood Purification* 17: 99-106

Ceballos-Picot I., Witko-Sarsat V., Merad-Boudia M., Nguyen A. T., Thevenin M., Jaudon M. C., Zingraf J., Verger C., Jungers P., Descamps-Latscha B. (1996): Gluthathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in a chronic renal failure. *Free radical Biology & Medicine* 21: 845-853

Chaudhary A. K., Nokubo M., Reddy G. R., Yeola S. N., Morrow J. D., Blair I. A., Marnett L. J. (1994): Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* 265: 1580-1581

Clark W. R., Gao D. (2002): Properties of membranes used for hemodialysis therapy. *Seminars in Dialysis* 15(1): 191-195

Clermont G., Lecour S., Lahet J.-J., Siohan P., Vergely C., Chevet D., Rifle G., Rochette L. (2000): Alteration in plasma capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. *Cardiovascular Research* 47: 618-623

Collins A. R. (1999): Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *BioEssays* 21: 238-246

Collins A. R., Dušinská M., Gedik C. M., Štětina R. (1996): Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives* 104: 465-469

Dandona P., Thusu K., Cook S., Snyder B., Makowski J., Armstrong D., Nicotera T. (1996): Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *The Lancet* 347: 444-445

Don B. G., Salomonson T., Derendorf H., Geisser P. (1996): Pharmakokinetics of iron(III)-hydroxide sucrose complex after a single intravenous dose in healthy volunteers. *Arzneimittel-Forschung* 46: 516-21

Daschner M., Lenhartz H., Bötticher D., Schaefer F., Wollschläger M., Mehls O., Leichsenring M. (1996): Influence of dialysis on plasma lipid peroxidation products and antioxidant levels. *Kidney International* 50: 1268-1272

Dedon P. C., Plataras J. P., Rouzer C. A., Marnett L. J. (1998): Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: Formation of the pyrimidopurinone adduct of deoxyguanosine by base propenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11113-11116

Delves P. J., Roitt I. M. (2000): *Advances in Immunology, The immune system*. New England Journal of Medicine 343 (1): 37-49

Diem K., Lentner C. (1975): *Wissenschaftliche Tabellen, Documenta Geigy, 7.Auflage*, Thieme Verlag

Dietrich H. (2000): Einfluss der Verarbeitungstechnologie auf gesundheitlich relevante Inhaltsstoffe von Fruchtsäften und Getränken. *Der Oenologe* 3: 19-21

Dietrich H. (2002): persönliche Mitteilung

Donica H. (2001): Evaluation of lipids Peroxidation products vs. proinflammatory cytokines in hemodialized patients. *Renal Failure* 23 (2): 231-238

Dursun E., Ozben T., Süleymanlar G., Dursun B., Yakupoglu G. (2002): Effect of hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. Clin. Chem. Lab. Med. 40 (10): 1009-1013

Eiselt J., Racek J., Opatrny K. Jr. (2000): Oxidative stress: the effect of erythropoietin and the dialysis membrane. The International Journal of Artificial Organs 23 (1): 33-40

Eiselt J., Racek J., Trefil L. Oy K. Jr. (2001): Effects of a vitamin E-modified dialysis membrane and vitamin C infusion on oxidative stress in hemodialysis patients. Artificial Organs 25 (6): 430-436

Eisenbrand G., Metzler M. (2001): Toxikologie für Chemiker, korrigierter Nachdruck, Thieme-Verlag

Eisenbrand G., Schreier P. (Hrsg.)(1995a): Römpp Lebensmittelchemie, Thieme Verlag

Eisenbrand G., Schuhmacher J. und Gölzer P. (1995b): The influence of glutathione and detoxifying enzymes on DNA damage induced by 2-alkenals in primary rat hepatocytes and human lymphoblastoid cells. Chemical Research in Toxicology 8: 40-46

Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biology & Medicine 11: 81-128

Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neil K.L. (1995): The comet assay: A comprehensive review. Mutation Research 339: 37-59

Fang J.-L., Vaca C. E., Valsta I. M., Mutanen M. (1996): Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition. Carcinogenesis 17 (5): 1035-1040

Fresenius Kabi (1999): Klinische Normalwerte

Gallagher E.P., Kavanagh T.J., Eaton D.L. (1994): Glutathione, oxidized Glutathione, and Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods in Toxicology*, 1b: 349-366

Galli F., Ronco C. (2000): Oxidant stress in Hemodialysis. *Nephron* 84: 1-5

Gerardi G. M., Usberti M., Martini G., Albertini A., Sugherini L., Pompella A., DiLorenzo D. (2002): Plasma total antioxidant capacity in hemodialyzed patients and its relationship to other biomarker of oxidative stress and lipid peroxidation. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40 (2): 104-110

Glaab V. (2001): Charakterisierung des toxischen Potentials von α,β -ungesättigten Carbo-nylverbindungen mit *in-vitro* Testmethoden, Dissertation, Universität Kaiserslautern

Glaab V., Eisenbrand G., Collins A. R., Janzowski C. (2001): DNA damaging potential, mutagenicity and glutathione depletion of 2-cyclohexene-1-one in mammalian cells, compared to food relevant 2-alkenals. *Mutation Research* 497: 185-197

Gupta A. (2000): Iron infusion into arterial blood line during haemodialysis: a novel method to remove free iron and reduce oxidative damage. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15: 1482

Ha T. K. K., Talwar D., Cooney J., Simpson K., O'Reilly D., Lean M. E. J. (1996): Abnormal antioxidant vitamin and carotenoid status in chronic renal failure. *Q. J. Med.* 89: 765-769

Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1999): *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Edition, Oxford University Press

Handelman G. J. (2000): Evaluation of oxidant stress in dialysis patients. *Blood Purification* 18: 343-349

Handelman G. J., Walter M. F., Adhikarla R., Gross J., Dallai G. E., Levin N. W., Blumberg J. B. (2001): Elevated plasma F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney International* 59: 1960-1966

- Hassan, M. Q., Hussain, S. A., Zaki, M. A., Alsharif, N. Z., Stohs, S. J. (1995): Protective effects of antioxidants against uraemia-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in humans. *Pharmacology & Toxicology* 77: 407-411
- Hasselwander O., Young I. S. (1998): Oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radical Research* 29: 1-11
- Hegbrant, J., Bengtson, U. H: (1999): Vitamin C and E as antioxidants in hemodialysis patients. *The International Journal of Artificial Organs* 22 (2): 69-73
- Hertog M. G. L., Feskens E. J. M., Hollmann P. C. H., Katan M. B. Kromhout D. (1993): Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342: 1007-1011
- Hildebrandt et al., (1993): *Medizinsches Wörterbuch*, 257. Auflage. Walter de Gruyter Verlag
- Hoeijmakers J. H. J. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374
- Hollmann P. C. H., Katan M. B. (1999): Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* 37:937-942
- Hörl W. H. (1998): Genesis of the uraemic syndrome: Role of uraemic toxins. *Wiener klinische Wochenschrift* 110: 511-520
- Horváthová E., Slameňová D., Hlinčíková L., Mandal T.K., Gábelová A., Collins A.R. (1998): The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research* 409: 163-171
- Ikizler T. A., Morrow J. D., Roberts L. J., Evanson J. A., Becker B., Hakim R. M., Shyr Y., Himmelfarb J. (2002): Plasma F₂-Isoprostane levels are elevated in chronic hemodialysis patients. *Clinical Nephrology* 58 (3): 190-197

- Jackson P., Loughrey C. M., Lightbody J. H., McNamee P. T., Young I. S. (1995): Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clinical Chemistry* 41 (8): 1135-1138
- Jadoul M., Ueda Y., Yasuda Y., Saito A., Robert A., Ishida N., Kurokawa K., van Ypersele de Strihou C., Miyata T. (1999): Influence of hemodialysis membrane type on pentosidine plasma level, a marker of "carbonyl stress". *Kidney International* 55: 2487-2492
- Janero D. R. (1990): Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine* 9: 515-540
- Janzowski C., Glaab V., Samimi E., Schlatter J., Eisenbrand G. (2000): 5-Hydroxymethylfurfural: Assessment of mutagenicity, DNA damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology* 38: 801-809
- Janzowski C., Glaab V., Müller C., Strässer U., Kamp H. G., Eisenbrand G. (2003): α , β -unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mutagenesis*, im Druck
- Jaruga P., Dizdaroglu M. (1996): Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acid Research* 24 (8): 1389-1394
- Kan E., Ündeger Ü., Bali M., Basaran N. (2002): Assessment of DNA strand breakage by alkaline Comet Assay in dialysis patients and the role of vitamin E supplementation. *Mutation Research* 520: 151-159
- Kassie F., Parzefall W., Knasmüller S. (2000): Single cell gel electrophoresis assay: A new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research* 463: 13-31
- Kaysen G. A. (2000): Inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease. *Advances in Nephrology* 30: 201-214

- Kaysen G. A. (2001): The microinflammatory state in uremia: Causes and potential consequences. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 1549-1557
- Kelly S. A., Havrilla C. M., Brady T. C., Abramo K. H., Levin E. D. (1998): Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems. *Environmental Health Perspectives* 106 (7): 375-384
- Klaunig J.E., Xu Y., Isenberg J.S., Bachowski S., Kolaja K.L., Jiang J., Stevenson D.E. Walborg E. Jr. (1998): The Role of Oxidative Stress in Chemical Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 106 (Suppl. 1): 289-295
- Klinke R., Silbernagl S. (1996): *Lehrbuch der Physiologie*, Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage
- Kosch M., Bahner U., Bettger H., Matzkies F., Teschner M., Schaefer R. (2001): A randomized, controlled parallel-group trial on efficacy and safety of iron sucrose (Venofer[®]) vs iron gluconate (Ferrlecit[®]) in haemodialysis patients treated with rHuEpo. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16: 1239-1244
- Laval J. (1996): Role of DNA Repair Enzymes in the cellular Resistance to oxidative Stress. *Pathologie Biologie* 44 (1): 14-24
- Lauratti C., Singh R., Lagneau C., Farmer P. B., Plastaras J. P., Marnett L. J., Shuker D. E. (1998): Determination of malondialdehyde-induced DNA damage in human tissues using an immunoslot blot assay. *Carcinogenesis* 19 (11): 1919-1924
- Loft S., Poulsen H.E. (1996): Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* 74: 297-312
- MacGinley R., Westhuyzen J., Saltisse D., Morgan C., Healy H., Thirlwell G. K., Disney A. P. S. (2001): Evaluation of a novel vitamin E coated cellulosic membrane hollow fiber dialyzer. *ASAIO Journal* 47: 66-73

Maisonneuve P., Agodoa L., Gellert R., Stewart J. H., Buccianti G., Lowenfels A. B., Wolfe R. A., Jones E., Disney A. P. S., Briggs D., McCredie M., Boyle P. (1999): Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *The Lancet* 354: 93-99

Makropoulos W., Kocher K., Heintz B., Schwarz E. R., Mertens P. R., Stefanidis I. (2000): Urinary thymidine glycol as a biomarker for oxidative stress after kidney transplantation. *Renal Failure* 22: 499-510

Marnett L. J. (1999): Lipid peroxidation- DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* 424: 83-95

McCall M.R., Frei B. (1999): Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology & Medicine* 26: 1034-1053

McDougall I. C. (2000): Intravenous administration of iron in epoetin-treated haemodialysis patients – which drugs, which regimen? *Nephrol. Dial. Transplant.* 15: 1743-1745

McGrath L. T., Douglas A. F., McClean E., Brown J. H., Doherty C. C., Johnston G. D., Archbold G. P. (1995): Oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. *Clinica Chimica Acta* 235 (2): 179-188

Mimic-Oka, J., Simic, T., Djukanovic, L. (2002): Epoetin treatment improves red blood cell and plasma antioxidant capacity in hemodialysed patients. *Renal Failure* 24 (1): 77-87

Miyata T., Kurokawa K., van Ypersele de Strihou, C. (2000): Advanced glycation and lipoxidation end products: Role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 1744-1752

Müller C. (2000): Untersuchungen zur oxidativen DNA Schädigung durch 2-Cyclohexen-1-on und trans-2-Hexenal. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

- Nawroth P. P., Bierhaus A., Vogel G. E., Hofmann M. A., Zumbach M., Wahl P., Ziegler R. (1999): Nichtenzymatische Glykierung und oxidativer Stress bei chronischen Erkrankungen und Diabetes mellitus. *Medizinische Klinik* 94: 29-38
- Netzel M., Strass G., Kaul C., Bitsch I., Dietrich H., Bitsch R. (2002) *In vivo* antioxidative capacity of a composite berry juice. *Food Research International* 35: 213-216
- Niesink R. J. M., deVries J., Hollinger M. A. (1996): *Toxicology – Principles and Applications*. CRC Press
- Omenn G. S., Goodman G. E., Thornquist M. D., Balmes J., Cullen M. R., Glass A., Keogh J. P., Meyskens F. L., Valanis B., Williams J. H., Barnhart S., Hammar S. (1996) Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine* 334: 1150-1155
- Ostling O., Johanson K. J. (1984): Microelectrophoresis study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 123: 291-298
- Ozden M., Maral H., Akaydin D., Cetinapl P., Kalender B. (2002): Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. *Clinical Biochemistry* 35: 269-273
- Parrkinen J., von Bonsdorff L., Peltonen S., Grönhagen-Riska C., Rosenlöf K. (2000): Catalytically active iron and bacterial growth in serum of hemodialysis patients after i.v. iron-saccharate administration. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15: 1827-1834
- Pasaoglu H., Muhtaroglu S., Günes M., Utas C. (1996): The role of oxidative state of glutathione and glutathione-related enzymes in anemia of hemodialysis patients. *Clinical Biochemistry* 29 (6): 567-572
- Perez Fernandez R., Martin Mateo M. C., De Vega L., Bustamante Bustamante J., Herrero M., Bustamante Munguira E. (2002): Antioxidant enzyme determination and a study of lipid Peroxidation in renal transplantation. *Renal Failure* 24: 353-359

Peuchant E., Carbonneau M. A., Dubourg L., Thomas M. J., Perromat A., Vallot C., Clerc M. (1994): Lipoperoxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing haemodialysis: vitamins A, E, and iron status. *Free Radical Biology & Medicine* 16 (3): 339-46

Raj D. S. C., Choudhury D., Welbourne T. C., Levi M. (2000): Advanced glycation end products: A nephrologist's perspective. *American Journal of Kidney Diseases* 35 (3): 365-380

Reetz, F. (2001): persönliche Mitteilung

Remuzzi G., Perico N., Locatelli G., Gridelli B. (2002): Wege aus dem Organmangel. *Spektrum der Wissenschaft* (11): 46-53

Rice-Evans C. A. (2000): Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status *in vivo*: procedures and limitations. *Free Radical Research* 33: S59-66

Roob J. M., Khoschorub G., Tiran A., Horina J. H., Holzer H., Winklhofer-Roob B. M. (2000): Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 539-549

Ross E. A., Koo, L. C., Moberly, J.B. (1997): Low whole blood and erythrocyte levels of glutathione in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases* 30 (4): 489-494

Rydberg B., Johanson K.J. (1978): Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells, *DNA Repair and Mechanisms* (eds. Hanawalt E.C., Friedberg E.C. and Fox C.F.), Academic Press, New York, 465-468

Sarre H., Gessler U., Seybold D. (Hrsg.) (1988): *Nierenkrankheiten*. 5. neubearbeitete und erweiterte Auflage, Thieme Verlag

Schiffl H., Fischereder M., Sitter T. (1999): Biokompatibilität der Nierenersatztherapie. *Internist* 40: 37-48

Schönweiß G. (1998): *Dialysefibel 2*, 2. völlig neubearb. und erw. Auflage, Abakiss Verlag

Schwarz S. (2001): Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

Sies H. (1985): Oxidative Stress. Academic press

Sies H. (1991): Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. Am. J. Med. 91 (3C): 31S-38S

Sigma Diagnostics, Uric Acid Kit, Procedure No. 686

Simic-Ogrizovic S., Simic T., Reljic Z., Markovic S., Blagojevic R., Radivojevic D., Lezaic V., Djukanovic L., Mimic-Oka J. (1998): Markers of oxidative stress after renal transplantation. Transplantation International 11: S125-S129

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988): A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. Experimental Cell Research 175: 184-191

Singh R. (2002): Durchführungsprotokoll Immunoslotblot M₁dG , University of Leicester, UK

Singh R., Leuratti C., Josyula S., Sipowicz M. A., Diwan B. A., Kasprzak K. S., Schut H. A. J., Marnett L. J., Anderson L. M., Shuker D. E. G. (2001): Lobe-specific increases in Malondialdehyde DNA adduct formation in the livers of mice following infection with *Helicobacter hepaticus*. Carcinogenesis 22: 1281-1287

Sommerburg O., Grune T., Hampl H., Riedel E., Ehrich J. H. H., Siems W. G. (2000): Does treatment of renal anemia with recombinant erythropoietin influence oxidative stress in hemodialysed patients. Clinical Nephrology 53 Suppl. 1/2000: S23-S29

Stange J., Mitzner S. R., Risler T., Erley C. M., Lauchart W., Goehl H., Klammt S., Peszynski P., Freytag J., Hickstein H., Löhr M., Liebe S., Schareck W., Hopt U. T., Schmidt R. (1999): Molecular adsorbent recycling system (MARS): Clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. Artificial Organs 23 (4): 319-330

Stopper H., Boullay F., Heidland A., Vienken J., Bahner U. (2001): Comet-assay analysis identifies genomics damage in lymphocytes of uremic patients. *American Journal of Kidney Diseases* 38 (2): 296-301

Stopper H., Meysen T., Böckenförde A., Bahner U., Heidland A., Vamvakas S. (1999): Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. *American Journal of Kidney Diseases* 34 (3): 433-437

Stryer L. (1996): *Biochemie*, 4.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag

Tarng D.-C., Chen H.-W., Huang T.-P., Chen C.-L., Liu T.-Y., Wei Y.-H. (2002): Increased Oxidative Damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 1321-1330

Tarng D.-C., Huang T.-P., Wei Y.-H., Liu T.-Y., Chen H.-W., Chen T. W., Yang W.-C. (2000a): 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases* 36 (5): 934-944

Tarng D.-C., Huang T.-P., Liu T.-Y., Chen H.-W., Sung Y.-J., Wei Y.-H. (2000b): Effect of vitamin E-bonded membrane on the 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level in leukocyte DNA of hemodialysis patients. *Kidney International* 58: 790-799

Taylor J. E., Scott N., Hill A., Bridges A., Henderson I. S., Stewart W. K., Belch J. J. (1993): Oxygen free radicals and platelet and granulocyte aggregability in renal transplant patients. *Transplantation* 55: 500-504

Thier R., Bruening T., Kocher K., Blaszkewicz M., Makropoulos V., Sundberg A., Bolt H. M. (1999): Determination of urinary thymidine glycol using affinity chromatography, HPLC and post-column reaction detection: a biomarker of oxidative DNA damage upon kidney transplantation. *Archives of Toxicology* 73: 479-484

Tovbin D., Mazor D., Vorobiov M., Chaimovitz C., Meyerstein N. (2002): Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: role of inflammation. *American Journal of Kidney Diseases* 40 (5): 1005-1012

Tsuruoka S., Kawaguchi A., Nishiki K., Hayasaka T., Fukushima C., Sugimoto K., Saito T., Fujimura A. (2002): Vitamin E-bonded hemodialyzer improves neutrophil function and oxidative stress in patients with end-stage renal failure. *American Journal of Kidney Diseases* 39 (1): 127-133

Usberti M., Bufano G., Lima G., Gazzotti R. M., Tira P., Gerardi G., DiLorenzo D. (1999): Increased red blood cell survival reduces the need of erythropoietin in hemodialysed patients treated with exogenous glutathione and vitamin E-modified membrane. *Contributions to Nephrology* 127: 208-214

Usberti M., Gerardi G. M., Gazzotti R. M., Benedini S., Archetti S., Sugherini L., Valentini M., Tira P., Bufano G., Albertini A., DiLorenzo D. (2002a): Oxidative stress and cardiovascular disease in dialyzed patients. *Nephron* 91: 25-33

Usberti M., Gerardi G. M., Micheli A. M., Tira P., Bufano G., Gaggia P., Movilli E., Cancarini G. C., De Marinis S., D'Avolio G., Broccoli R., Manganoni A., Albertini A., DiLorenzo D. (2002b): Effects of a vitamin E-bonded membrane and of glutathione on anemia and erythropoietin requirements in hemodialysis patients. *J. Nephrol.* 15: 558-564

Vaca C. E., Vodicka P., Hemminki K. (1992): Determination of malonaldehyde-modified 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA by ³²P-postlabelling. *Carcinogenesis* 13 (4): 593-599

Vamvakas S., Bahner U., Heidland A. (1997): Erhöhte Krebsinzidenz bei terminaler Niereninsuffizienz: potentielle pathogenetische Mechanismen. *Schweizer Medizinische Wochenschrift* 127: 597-604

Vanholder R., Dell'Aquila R., Jacobs V., Dhondt A., Veys N., Waterloss M. A., Van Landschoot N., Van Biesen W., Ringoir S. (1993): Depressed phagocytosis in hemodialyzed patients: *in vivo* and *in vitro* mechanisms. *Nephron* 63 (4): 409-415

Vlassara H., Palace M. R. (2002): Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of Internal Medicine* 251: 87-101

Volpi, N., Tarugi, P. (1998): Improvement in the high-performance liquid chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma. *Journal of Chromatography B* 713: 433-437

Wei Y.-H. (1998): Oxidative Stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *P. S. E. B. M.* 217: 53-63

Weinstein T., Chagnac A., Korzets A., Boaz M., Ori Y., Herman M., Malachi T., Gafer U. (2000): Haemolysis in haemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15: 883-887

Weiss M. F. (1999): Pathogenic role of advanced glycation end-products (AGEs): An overview. *Peritoneal Dialysis International* 19 supplement 2: S47-S52

Zanen A. L., Adriaansen H. J. van Bommel E. F., Posthuma R., de Jong G. H. Th. (1996): 'Oversaturation' of transferrin after intravenous ferric gluconate (Ferrlecit®) in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 11: 820-824

9 Anhang

9.1 Untersuchung von Probanden und Patienten

9.1.1 Vergleich von Patienten vor HD und Probanden

9.1.1.1 Harnsäure-Bestimmung

Harnsäurekonzentration [μ M] im Plasma	
Probanden	Patienten
198	452
274	253
349	332
311	299
176	323
138	299
	493
	234
	280
	173

9.1.1.2 Glutathion-Bestimmung

GSSG-Konzentration [μM] in Vollblut	
Probanden	Patienten
24	74
26	66
43	51
48	40
19	35
43	47
	59
	58
	65
	35

tGSH-Konzentration [μM] in Vollblut	
Probanden	Patienten
960	1125
1262	1202
1143	851
1258	555
1238	899
732	1130
	1297
	1089
	917
	1320

9.1.1.3 Malondialdehyd-Bestimmung

MDA-Konzentration [μM] im Plasma	
Probanden	Patienten
1,81	1,25
1,89	1,60
1,45	1,33
1,45	2,02
1,64	1,83
2,52	1,55
1,19	1,60
1,17	1,20
1,83	2,02
1,66	1,07
1,73	1,72
1,43	2,28
	0,82

9.1.1.4 M₁dG-Bestimmung

M₁dG-Konzentration [10^{-8} Basen] in Leukozyten	
Probanden	Patienten
18,57	22,22
18,70	22,55
16,13	23,14
10,58	23,60
	21,01
	21,74

9.1.1.5 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

(Oxidative) DNA-Schäden [TI%] in Leukozyten			
Probanden		Patienten	
direkt	FPG	direkt	FPG
0,38	0,47	0,66	5,23
0,48	0,37	0,28	2,53
0,54	0,54	0,66	3,75
0,53	0,94	1,39	8,35
0,37	0,56	0,78	10,08
0,28	0,57	0,58	1,91
0,17	0,53	0,42	6,39
0,20	0,82	0,35	6,72
0,21	1,31	0,41	5,30
0,31	0,35	0,83	4,42
0,32	1,03	0,88	5,63
0,49	0,90	0,28	5,89
0,41	1,07	0,29	2,91
0,53	0,68	0,25	2,28
0,59	1,11	0,42	5,79
		0,38	10,97
		0,84	3,68
		0,87	4,55
		0,72	4,15
		1,02	5,15
		0,60	7,34

9.1.2 Patienten während HD

9.1.2.1 Harnsäure-Bestimmung

Harnsäure-konzentration [μM] im Plasma	vor HD	15'	30'	60'	120'	Ende	Ende + 10'	Ende + 20'
Patient HS 1	452	360	272	292	246	186	145	116
Patient HS 2	253	228	199	172	120	108	99	108
Patient HS 3	332	245	235	192	137	110	122	166
Patient HS 4	299	300	245	220	198	200	126	126
Patient HS 5	323	230	228	176	93	-	86	116
Patient HS 6	300	246	273	250	170	150	142	125
Patient HS 7	494	369	314	225	161	123	82	92
Patient HS 8	234	187	221	151	120	63	85	97
Patient HS 9	280	197	237	181	169	136	96	109
Patient HS 10	173	157	134	120	90	50	50	56

9.1.2.2 Glutathion-Bestimmung

GSSG-Konzentration [μM] in Vollblut	vor HD	15'	30'	60'	120'	Ende	Ende + 10'	Ende + 20'
Patient G 1	74	58	47	59	53	49	44	47
Patient G 2	66	38	47	40	89	57	71	26
Patient G 3	51	35	44	45	28	47	51	47
Patient G 4	40	30	37	26	28	-	39	22
Patient G 5	35	26	45	27	46	34	33	33
Patient G 6	47	39	28	26	48	44	37	40
Patient G 7	59	52	47	49	55	47	49	46
Patient G 8	58	58	60	54	57	62	58	57
Patient G 9	74	58	47	59	53	49	44	47
Patient G 10	66	38	47	40	89	57	71	26

tGSH-Konzentration [μM] in Vollblut	vor HD	15'	30'	60'	120'	Ende	Ende + 10'	Ende + 20'
Patient G 1	1125	996	1053	1087	1047	876	1052	1055
Patient G 2	1202	1084	1053	1127	1247	1167	1205	631
Patient G 3	851	790	814	820	764	904	848	815
Patient G 4	555	619	732	611	645	-	768	896
Patient G 5	899	875	908	807	954	852	915	848
Patient G 6	1130	983	896	877	938	915	925	985
Patient G 7	1297	1196	1167	1179	1063	1146	1279	1188
Patient G 8	1089	990	1036	938	993	1054	1054	1066
Patient G 9	918	821	826	757	940	1015	1053	1011
Patient G 10	1320	1168	1134	1259	1261	1132	1236	1253

9.1.2.3 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

DNA-Schäden [TI%] in Leu- kozyten	vor HD	15'	30'	60'	120'	Ende	Ende + 10'	Ende + 20'
Patient D 1	0,34	0,49	0,35	0,33	0,46	0,33	0,28	0,49
Patient D 2	0,38	0,61	0,42	0,53	0,3	0,42	0,78	0,46
Patient D 3	0,25	-	0,44	0,19	0,2	0,16	0,19	0,21
Patient D 4	0,28	0,42	0,46	0,33	0,7	0,38	0,65	0,52
Patient D 5	0,78	-	0,7	0,86	1,03	0,85	0,27	0,5
Patient D 6	0,66	0,67	0,35	0,72	0,46	0,65	-	0,37
Patient D 7	0,28	0,27	0,25	0,26	0,58	0,29	-	0,34
Patient D 8	0,38	0,51	0,54	0,45	0,39	0,83	-	0,71
Patient D 9	0,66	0,33	0,28	0,5	0,55	0,41	-	0,47
Patient D 10	0,42	0,61	0,36	0,71	0,52	-	-	-
Patient D 11	-	0,79	0,36	0,6	0,44	0,43	-	-
Patient D 12	0,71	0,52	0,5	0,48	0,37	0,38	-	0,5
Patient D 13	0,3	0,44	0,46	0,77	0,71	0,36	-	0,46
Patient D 14	0,41	0,46	0,75	0,97	0,24	0,65	-	0,47
Patient D 15	0,83	0,63	0,79	0,48	0,35	0,88	-	0,44
Patient D 16	0,88	0,66	0,38	0,99	0,61	0,34	-	0,71

Oxidative DNA-Schäden [TI%] in Leu- kozyten	vor HD	15'	30'	60'	120'	Ende	Ende + 10'	Ende + 20'
Patient D 1	2,33	-	2,22	4	5,77	5,62	2,15	3,93
Patient D 2	3,44	5,92	2,44	3,87	1,41	2,76	1,62	2,08
Patient D 3	5,89	13,83	8,99	8,26	5,50	9,11	5,64	6,55
Patient D 4	10,07	6,35	8,95	11,15	8,66	8,33	14,33	9,65
Patient D 5	5,23	6,44	5,20	5,02	4,64	5,59	-	8,37
Patient D 6	2,53	2,36	3,71	2,67	2,04	2,91	-	1,80
Patient D 7	10,97	13,80	7,81	9,61	11,54	8,38	-	8,48
Patient D 8	3,75	7,52	4,69	4,46	4,60	2,69	-	3,01
Patient D 9	5,79	5,88	4,62	7,78	3,97	2,64	-	4,12
Patient D10	15,13	28,54	10,86	17,24	11,47	6,96	-	20,86
Patient D 11	2,28	-	1,74	1,44	4,79	1,62	4,73	1,95
Patient D 12	5,78	7,88	6,45	10,58	13,48	7,85	-	6,75
Patient D 13	8,06	8,59	6,08	6,64	12,30	8,01	-	4,05
Patient D 14	5,30	2,16	2,53	3,96	2,75	4,01	-	4,32
Patient D 15	4,42	9,07	2,89	13,95	2,53	4,39	-	2,
Patient D 16	5,63	7,59	3,33	5,75	7,16	4,30	-	5,21

9.1.3 Untersuchung des Einflusses der Dialysemembranen in einer Cross Over Studie

9.1.3.1 Malondialdehyd-Bestimmung

MDA-Konzentration [µM] im Plasma	Terumo E15	Fresenius F8	Baxter DICEA 170
	Median	Median	Median
vor HD	1,33	1,23	1,55
15'	1,31	1,21	1,49
30'	1,28	1,21	1,41
60'	1,25	0,92	1,44
120'	1,39	1,25	2,01
Ende	1,44	1,38	1,93
Ende + 10'	1,61	1,15	2,27
Ende + 20'	1,44	1,16	1,4

9.1.3.2 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

(oxidative) DNA-Schäden [TI%] in Leukozyten	Terumo E15	Fresenius F8	Baxter DICEA 170
	Median	Median	Median
vor HD	0,76	0,76	0,84
vor HD + FPG	3,55	4,62	5,02
15' + FPG	4,75	3,93	5,56
30' + FPG	4,64	4	5,62
60' + FPG	4,81	4,75	5,28
120' + FPG	3,95	4,52	6,17
Ende + FPG	3,72	4,68	6,03
Ende + 20' + FPG	4,15	4,2	4,9

9.1.4 Einfluss der Anämiebehandlung mit Ferrlecit®

9.1.4.1 Malondialdehyd-Bestimmung

MDA-Konzentration [µM] im Plasma	vor Fe		5min nach Fe		25min nach Fe	
	HD ohne Fe-Inf.	HD mit Fe-Inf.	HD ohne Fe-Inf.	HD mit Fe-Inf.	HD ohne Fe-Inf.	HD mit Fe-Inf.
Patient E1	1,27	2,26	1,38	2,80	1,42	2,87
Patient E2	1,78	1,49	1,79	2,45	1,81	2,94
Patient E3	1,51	1,44	1,39	2,09	1,56	2,26
Patient E4	1,31	1,33	1,65	2,46	1,76	2,43
Patient E5	1,79	1,82	3,14	3,49	3,15	3,30
Patient E6	1,15	0,54	1,96	0,89	1,47	1,35
Patient E7	1,34	1,58	1,30	3,00	1,28	4,01
Patient E8	1,08	3,16	1,35	4,29	1,15	1,46
Patient E9	1,04	1,17	1,24	1,65	0,99	1,65
Patient E10	1,43	0,82	1,05	1,48	1,27	1,57
Patient E11	1,01	0,92	1,02	1,98	0,86	1,66

9.1.4.2 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

DNA-Schäden [TI%] in Leukozyten	vor Fe		5min nach Fe		25min nach Fe	
	HD ohne Fe-Inf.	HD mit Fe-Inf.	HD ohne Fe-Inf.	HD mit Fe-Inf.	HD ohne Fe-Inf.	HD mit Fe-Inf.
Patient E1	0,57	1,03	1,19	0,32	0,74	0,98
Patient E2	1,40	1,05	1,42	0,52	1,29	1,70
Patient E3	--	0,75	1,53	0,53	1,47	--
Patient E4	0,79	0,69	0,59	0,61	0,45	1,10
Patient E5	0,70	0,82	0,47	0,66	1,15	0,59
Patient E6	0,49	1,06	0,89	0,86	0,40	1,49
Patient E7	0,78	0,68	0,37	1,21	0,55	0,56
Patient E8	1,04	0,40	0,88	0,31	0,78	0,49
Patient E9	0,42	0,69	0,83	0,82	0,64	0,45
Patient E10	0,81	0,70	0,57	0,63	0,72	0,49

Oxidative DNA-Schäden [TI%] in Leukozyten	vor Fe		5min nach Fe		25min nach Fe	
	HD ohne Fe-Inf.	HD mit Fe-Inf.	HD ohne Fe-Inf.	HD mit Fe-Inf.	HD ohne Fe-Inf.	HD mit Fe-Inf.
Patient E1	4,33	9,42	5,36	7,47	5,78	9,34
Patient E2	5,37	6,32	5,79	6,81	3,84	5,05
Patient E3	6,65	5,61	4,64	4,78	3,40	6,32
Patient E4	6,81	4,11	5,91	4,63	5,65	9,72
Patient E5	6,15	4,94	3,82	5,94	4,06	7,11
Patient E6	3,52	5,03	1,64	3,53	2,12	8,46
Patient E7	4,05	5,71	2,75	3,90	3,72	5,80
Patient E8	4,68	1,56	3,50	3,91	1,80	2,09
Patient E9	1,25	2,91	1,50	4,81	1,60	3,23
Patient E10	3,47	5,48	2,08	2,95	2,69	2,09

9.1.5 Lebererkrankungen und Molecular Adsorbent Recycling System

9.1.5.1 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

Patient 1 DNA-Schäden [TI%] in Leukozy- ten	1.MARS-Behandlung		2.MARS-Behandlung	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
vor MARS	1,03	0,54	0,97	0,46
vor MARS + FPG	7,06	4,77	1,72	0,70
15'	0,59	0,22	0,51	0,06
15' + FPG	1,61	0,91	3,41	3,30
30'	0,35	0,06	0,62	0,18
30' + FPG	1,53	0,41	1,93	0,58
60'	0,36	0,08	0,72	0,08
60' + FPG	4,43	3,03	1,22	0,41
3h	0,52	0,03	0,48	0,08
3h + FPG	1,10	0,61	1,89	1,15
6h	1,29	0	1,01	0,35
6h + FPG	2,37	0,39	1,89	1,15
Ende	1,09	0,17	1,53	0
Ende + FPG	3,26	2,27	2,24	1,60

Patient 2 DNA-Schäden [TI%] in Leukozy- ten	1.MARS-Behandlung		2.MARS-Behandlung		3.MARS-Behandlung	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
vor MARS	1,21	0,38	0,83	0,39	-	-
vor MARS + FPG	7,99	4,30	11	1,75	-	-
15'	1,24	0,45	0,89	0,26	-	-
15' + FPG	7,34	2,35	5,65	2,90	-	-
30'	1,23	0,04	1,25	0,73	1,25	0,96
30' + FPG	8,12	6,36	4,99	3,14	14,58	7,67
60'	1,13	0,10	0,95	0,22	1,11	0,27
60' + FPG	6,89	4,80	8,92	3,79	8,65	4,54
3h	0,76	0,15	1,09	0,15	1,06	0,57
3h + FPG	4,82	2,80	5,11	0,81	12,35	9,77
6h	0,97	0,43	2,13	0,98	0,92	0,10
6h + FPG	6,80	3,38	6,32	5,01	12,44	9,67
Ende	2,80	0,83	0,83	0,14	-	-
Ende + FPG	5,58	2,84	3,65	2,62	-	-

Patient 3 DNA-Schäden [TI%] in Leukozy- ten	1.MARS-Behandlung		2.MARS-Behandlung	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
vor MARS	0,98	0,29	2,02	0,30
vor MARS + FPG	6,69	1,17	9,57	2,22
15'	-	-	1,04	0,06
15' + FPG	-	-	6,40	1,35
30'	1,13	0,53	1,65	0,39
30' + FPG	4,62	1,49	8,63	2,62
60'	1,57	0,83	1,44	0,13
60' + FPG	4,16	2,58	8,83	1,44
3h	0,76	0,07	1,01	0,36
3h + FPG	3,47	0,99	8,99	1,60
6h	1,18	0,02	1,04	0,03
6h + FPG	4,13	1,56	8,22	2,47
Ende	0,92	0,10	1,54	0,50
Ende + FPG	9,46	4,60	5,16	2,19

Patient 4 DNA-Schäden [T1%] in Leukozy- ten	1.MARS-Behandlung		2.MARS-Behandlung		3.MARS-Behandlung	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
vor MARS	2,67	0,27	1,25	0,03	0,39	0,05
vor MARS + FPG	3,71	2	2	0,86	3,11	1,05
15'	1,24	0,44	-	-	-	-
15' + FPG	3,09	1,46	2,93	0,60	-	-
30'	0,72	0,13	-	-	1,06	0,42
30' + FPG	2,91	1,96	3,91	1,27	2,79	1,14
60'	2,13	1,65	-	-	0,74	0,06
60' + FPG	2,99	1,12	2,62	0,13	3,13	1,29
3h	1,04	0,37	0,59	0,18	0,54	0,01
3h + FPG	5,40	1,09	2,29	1,27	3,16	2,11
6h	1,03	0,41	1,11	0	0,82	0,47
6h + FPG	5,74	2,79	4,34	1,15	3,28	1,55
Ende	1,96	0,61	0,70	0	1,03	0,14
Ende + FPG	4,23	2,63	2,57	0,39	3,20	0,75

DNA-Schäden [TI%] in Leukozyten			
Patienten mit alkohol- bedingter Hepato- pathie aus Schwarz (2001)		Patienten vor MARS- Behandlung	
direkt	FPG	direkt	FPG
0,36	2,11	1,00	4,39
0,28	22,67	1,02	9,50
0,27	4,31	1,50	8,13
0,28	4,12	1,44	2,94
0,35	1,99		
0,19	2,31		
0,28	1,55		
0,30	1,68		
0,54	0,69		
0,16	0,66		
0,34	1,43		
0,33	1,24		
0,50	0,87		
0,32	1,70		
0,38	3,01		
0,95	12,63		

9.1.6 Patienten nach Nierentransplantation

9.1.6.1 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

DNA-Schäden [TI%] in Leukozyten					
Probanden		HD-Patienten		NTX-Patienten	
direkt	FPG	direkt	FPG	direkt	FPG
0,38	0,47	0,66	5,23	0,46	2,45
0,48	0,37	0,28	2,53	0,75	6,13
0,54	0,54	0,66	3,75	0,61	13,05
0,53	0,94	1,39	8,35	0,73	9,08
0,37	0,56	0,78	10,08	0,39	5,81
0,28	0,57	0,58	1,91	0,79	3,85
0,17	0,53	0,42	6,39	0,28	17,53
0,20	0,82	0,35	6,72	0,81	10,97
0,21	1,31	0,41	5,30	0,59	19,26
0,31	0,35	0,83	4,42	1,53	9,72
0,32	1,03	0,88	5,63	0,53	14,42
0,49	0,90	0,28	5,89	-	9,55
0,41	1,07	0,29	2,91	0,41	15,73
0,53	0,68	0,25	2,28	-	15,16
0,59	1,11	0,42	5,79	0,75	12,03
		0,38	10,97	0,61	5,55
		0,84	3,68	0,33	2,78
		0,87	4,55	0,36	3,87
		0,72	4,15	0,49	3,30
		1,02	5,15	0,51	3,57
		0,60	7,34	0,34	4,90
				0,65	3,49
				0,73	12,94
				1,27	10,60
				0,90	15,14
				0,56	4,03
				1,13	7,25

9.1.7 Erste Versuche zur Intervention mit einem flavonoid/polyphenolreichen Mischfruchtsaft

9.1.7.1 Malondialdehyd-Bestimmung

MDA-Konzentration [μM] im Plasma	Probanden	
	Mittelwert	SD
Woche 1	1,56	0,34
Woche 2	1,43	0,32
Woche 3	1,55	0,46
Woche 4	1,45	0,36

9.1.7.2 Messung von (oxidativen) DNA-Schäden (Comet Assay)

(oxidative) DNA-Schäden [TI%] in Leukozyten	Probanden	
	Mittelwert	SD
Woche 1	3,78	1,12
Woche 1 + FPG	17,14	9,38
Woche 2	2,46	0,64
Woche 2 + FPG	24,73	8,87
Woche 3	1,86	0,82
Woche 3 + FPG	16,44	4,92
Woche 4	1,43	0,77
Woche 4 + FPG	13,36	5,11

Lebenslauf

Persönliches

Christoph Müller
geboren am 25.10.1974 in Wadern
verheiratet

Schulbildung

1981-1985	Grundschule Britten
1985-1994	Abitur am Peter-Wust-Gymnasium Merzig

Allgemeiner Wehrdienst

1994-1995	Wehrdienst als Sanitätssoldat
-----------	-------------------------------

Studium

1995-2000 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Kaiserslautern

1995-1997	Grundstudium
23.10.1997	staatliche Vorprüfung

1998-2000	Hauptstudium
03.05.2000	Abschluss des Studienganges Diplom-Lebensmittelchemie und erste Staatsprüfung Diplomarbeit bei Prof. Dr. Eisenbrand: „Untersuchungen zur oxidativen DNA-Schädigung durch 2-Cyclohexen-1-on und trans-2-Hexenal“

April 2000

bis September 2003	Promotion als wissenschaftlicher Angestellter bei Herrn Prof. Dr. Eisenbrand am Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Universität Kaiserslautern in Zusammenarbeit mit dem Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern: „Untersuchungen zum oxidativen Stress bei Hämodialysepatienten“
--------------------	--

Posterbeiträge und Publikationen

2000:

91. Jahrestagung der American Association for Cancer Research, San Francisco, 01.-05.04.:

- C. Janzowski, V. Glaab, **C. Müller**, A.R. Collins, G. Eisenbrand: Induction of oxidative DNA damage in V79 cells following incubation with (*E*)-2-hexenal and 2-cyclohexene-1-one. Proc. Am. Ass. Cancer Res. 41, 234

41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März:

- V. Glaab, **C. Müller**, G. Eisenbrand, C. Janzowski: α,β -Unsaturated carbonyl compounds: inducers of oxidative DNA modifications? Arch. Pharmacol. 361 (Suppl), R 155

Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Karlsruhe, 03.-04.03.:

- V. Glaab, A. Matyas, **C. Müller**, G. Eisenbrand, C. Janzowski: α,β -Ungesättigte Carbonylverbindungen: Beeinflussung des zellulären Glutathionspiegels. Lebensmittelchemie 54, 74
- C. Janzowski, V. Glaab, A. Matyas, **C. Müller**, G. Eisenbrand: α,β -Ungesättigte Carbonylverbindungen in Lebensmitteln: In-vitro Untersuchungen zur Induktion von oxidativem Streß an Säugerzellen. Lebensmittelchemie, 54, 134

Jubiläumsveranstaltung des Schwerpunktes Medizin, Naturwissenschaft, Technik (MNT) der Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, 09.12.:

- C. Janzowski, **C. Müller**, M. Riedel, T. Morgenstern, F.W. Albert, J. Vienken, G. Eisenbrand: Nachweis oxidativer DNA-Schäden in peripheren Leukocyten von Hämodialysepatienten

14.Symposium des nephrologischen Arbeitskreises Saar-Pfalz-Mosel e.V. in Kaiserslautern:

- C. Janzowski, **C. Müller**, M. Riedel, T. Morgenstern, F.W. Albert, J. Vienken, G. Eisenbrand: Nachweis oxidativer DNA-Schäden in Lymphozyten von Hämodialysepatienten

Dieses Poster gewann einen mit 1000DM dotierten Preis

2001:

92. Jahrestagung der American Association for Cancer Research, New Orleans, 24.-28.03.:

- C. Janzowski, **C. Müller**, M. Riedel, T. Morgenstern, F.W. Albert, J. Vienken, G. Eisenbrand: Oxidative DNA damage of peripheral leukocytes in hemodialysis patients. Proc. Am. Ass. Cancer Res. 41, 234

42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 13.-15.03.:

- **C. Müller**, M. Riedel, T. Morgenstern, F.W. Albert, J. Vienken, G. Eisenbrand, C. Janzowski: Oxidative DNA damage in leukocytes; a sensitive biomarker for oxidative stress in hemodialysis patients. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 363 (Suppl), R161

International Comet Assay Workshop der GUM, Ulm, 22.-24.07.:

- **C. Müller**, M. Riedel, T. Morgenstern, F. W. Albert, J. Vienken, A.R. Collins, G. Eisenbrand, C. Janzowski: Comet Assay: a sensitive method to detect oxidative DNA damage in leukocytes of hemodialysis patients

45. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft, Saarbrücken, 08.-10.03.:

- **C.Müller**, M.Riedel, T.Morgenstern, F.W. Albert, J.Vienken, G. Eisenbrand, C.Janzowski: Nachweis oxidativer DNA-Schäden in peripheren Leukocyten von Hämodialysepatienten

2002:

93. Jahrestagung der American Association for Cancer Research, San Francisco, 06.-10.04.:

- C. Janzowski, **C. Müller**, M. Gradinger, T. Rath, F.W. Albert, J. Vienken, and G. Eisenbrand: Increased Oxidative Stress during Hemodialysis in Uremic Patients. Proc. Am. Ass. Cancer Res. 43, 865

43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 12.-14.03.:

- **C. Müller**, M. Gradinger, T. Rath, F.W. Albert, J. Vienken, G. Eisenbrand and C. Janzowski: Increased oxidative stress in patients undergoing hemodialysis. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 365 (Suppl), R152

46. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft, Saarbrücken, 28.02.-02.03.:

- **C. Müller**, M. Gradinger, T. Rath, F.W. Albert, J. Vienken, G. Eisenbrand, C. Janzowski: Erhöhter oxidativer Stress bei Hämodialysepatienten
- C. Janzowski, **C. Müller**, S. Schwarz, F.W. Albert, G. Eisenbrand: Oxidative DNA-Schädigung in Leukozyten von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen

Dieses Poster gewann einen mit 500€ dotierten Preis

Symposium of the Senate Commission on Food Safety (SKLM): „Functional Food: Safety Aspects“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Karlsruhe, 05.-07.05.:

- S. Schäfer, H.G. Kamp, **C. Müller**, B. Haber, G. Eisenbrand, C. Janzowski: Modulation of oxidative DNA damage by constituents of carob fibre

2003:

12. International AEK Cancer Congress, Würzburg, 25.-28.03.:

- **C. Müller**, M. Gradinger, T. Rath, F.W. Albert, J. Vienken, G. Eisenbrand and C. Janzowski: Enhanced oxidative stress in hemodialysis (HD) patients.
- F.W. Albert, C. Janzowski, T. Rath, **C. Müller**: Oxidativer Stress bei chronischer Niereninsuffizienz und unter Nierenersatztherapie. Nephrologie im Dialog, 01/03 S.8
- C. Janzowski, V. Glaab, **C. Müller**, U. Strässer, H.G. Kamp, A.R. Collins, G. Eisenbrand: α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds: Induction of oxidative DNA-Damage in mammalian Cells; Mutagenesis, 18, 465-470
- **C. Müller**, G. Eisenbrand, M. Gradinger, T. Rath, F.W. Albert, J. Vienken, R. Singh, P. B. Farmer and C. Janzowski: Effects of hemodialysis, dialyser type and iron infusion on oxidative stress in uremic patients; Free Radical Biology & Medicine, eingereicht

Danken möchte ich

- allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und die man nur allzu leicht vergisst.
- Herrn Prof. Vienken für seine Idee, toxikologische Marker auf medizinische/-medizintechnische Fragestellungen anzuwenden.
- Herrn Prof. F. W. Albert und Frau Dr. Albert für ihre Diskussionsbereitschaft und ihr Interesse an der „richtigen“ Wissenschaft.
- Martina Gradinger, Martin Riedel, Bernd Weber, Herrn Dr. Rath und Bianca Bischoff für die Mithilfe bei der Planung, Organisation und Durchführung der Untersuchungen und den Einblick in die Mediziner-Welt.
- den Schwestern und Pflegern des Westpfalz-Klinikums KL, hauptsächlich der Station 9/2 - Nephrologie, für die Blutabnahmen bei den Patienten.
- allen Patienten und Probanden (u. a. Sekretärinnen, Technikern, Mitdoktoranden, promovierten Wissenschaftlern, Professoren, Schwestern, Ärzten, Oberärzten und Chefärzten), die mutig - im Dienste der Wissenschaft – ihren kostbaren Lebenssaft zur Verfügung stellten und aufgrund des Datenschutzes hier nicht genannt werden dürfen.
- Dr. Raj Singh und Peter Farmer für die Möglichkeit ein paar Tage an der University of Leicester, UK zu verbringen und dort auch einiges über die englische (Fußball-)Kultur zu erfahren und Frieda Teichert, die mir den Aufenthalt durch Kochen, Eisspenden und Hilfe im Labor erleichtert hat.
- den 54ern und 56ern Sandra Jacobs, Michael Habermayer, Stefan Mühlbeyer, Zeina, Melanie Kern, Frankie Hippe und Sandra Vatter.
- meiner Forschungspraktikantin Kirsten Würth für die frühen, schönen und lustigen Stunden im Krankenhaus.
- den Mittwoch-Frühstückern.
- den Dienstag- oder Donnerstag-Fußballern.
- meinen ehemaligen Laborkollegen Volker Glaab, Agnes Matyas, Ute Sträßer, Hennicke Kamp, Anette Höll, Sandra Schwarz, Kirsten Würth, Sandra Schäfer, Tamara Weisel, Silke Fritzen und Maria Lorez/Mork für die Diskussions- und die Hilfsbereitschaft.
- den Korrekturlesern, die sich die Zeit genommen haben.
- den Labornachbarn Rainer Scheuermann, Aribert Vetter (C&A Computers), Silke Ripp und Eva Gorgus für die netten und schlaun Gedanken von nebenan.
- Rainer Scheuermann für die schönen Grillabende am See und zusammen mit Matthias Baum für die Unterhaltung im Kaffeezimmer.

- den Fachtoxkurskollegen und Ferienwohnungsliebhabern Anette, Hennicke, Evelyn, Eric, Sandra und Matthias.
- unseren guten Seelen im Sekretariat Ingrid Hemm und Heike Syring, für die vielen kleinen Gefallen.
- Volker Glaab und Tatiana Höfer für die Ausblicke und die schönen Wochenenden.
- Elmar, Agnes, Stefan, Stefan, Sandra, Peter, Anette, Helwig, Silke und Hennicke für die schönen und entspannenden Feiern/Feten/Treffen und Abende.
- Silke für die vielen tollen Doppelkopfabende und -nächte, die gemeinsamen Einkäufe, den schönen Urlaub und die Kurzurlaube, die Gespräche und Lästereien über uns nahe stehende Personen.
- Anette für die vielen Unterhaltungen und Sorgen, die uns vereinen, die Telefonanrufe, die Spaziergänge und die zukünftigen Stunden im Auto oder bei der Arbeit.
- Lilalaunebär Sandra für die unterhaltsamen Computerprobleme, die Aufmunterungen, die langen Telefonate, das Zuhören und Verständnis.
- Hennicke für die Umsetzung des dt. Reinheitsgebotes, die DoKo-Spiele und die dazugehörenden Debatten, Spaziergänge (mit Lyoner, Bier und Flachmann), Urlaube, Tagungen, noch mehr fürs Zuhören, Problemlösungen, Diskussionen über Statistik und auch sinnvollere Themen und die Fähigkeit böse Geister zu Vertreiben.
- Besonderer Dank gebührt natürlich meiner Familie, meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.
- Mein größter Dank gilt Vera für die wundervollen, gemeinsamen Jahre in Kaiserslautern.